



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Suplementación mineral y vitamínica de vacas lecheras en trópico durante el periodo de transición: efecto sobre perfil metabólico, lácteo, hormonal y resistencia insulínica**

KATHERINE GARCIA ALEGRIA

Universidad Nacional De Colombia  
Facultad De Ciencias Agropecuarias  
Coordinación General De Posgrados  
Palmira, Colombia  
2015



# **Suplementación mineral y vitamínica de vacas lecheras en trópico durante el periodo de transición: efecto sobre perfil metabólico, lácteo, hormonal y resistencia insulínica**

**KATHERINE GARCIA ALEGRIA**

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Ciencias Agrarias**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

**Producción Animal Tropical**

**DIRECTOR:**

**ROMULO CAMPOS GAONA**

**MV, MSc, DSc**

**Grupo de Investigación:**

**“Conservación, Mejoramiento y Utilización del Ganado Criollo Hartón del Valle y otros  
Recursos Genéticos Animales en el Suroccidente Colombiano”**

**Universidad nacional de Colombia  
Facultad de ciencias agropecuarias  
Coordinación general de posgrados  
Palmira, Colombia  
2015**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE PALMIRA

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**ACTA DE JURADO DE TESIS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS  
LINEA DE INVESTIGACIÓN PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL**

En Palmira a los 03 días del mes de Junio de 2015, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores, CLARISSA STRIEDER BARBOZA y FELIX D. GONZÁLEZ.

Para calificar la Tesis de Grado de:

**KATHERINE GARCÍA ALEGRÍA**

Titulada:

**"Suplementación mineral y vitamínica de vacas lecheras en trópico durante el periodo de Transición: Efecto sobre perfil metabólico, lácteo, hormonal y resistencia insulínica",** bajo la dirección del profesor Rómulo Campos Gaona.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los doctores CLARISSA STRIEDER BARBOZA y FELIX D. GONZÁLEZ, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA   x  

REPROBADA       

CLARISSA STRIEDER BARBOZA.

FELIX D. GONZALEZ.

*A ti, Armando, porque desde que llegaste a mi vida fuiste mi voz de calma en medio de la tormenta, por escucharme e interesarte en cada detalle de mi tesis aunque no compartiéramos el mismo espacio académico, por tus consejos, tu paciencia, tu cariño, por compartir un poco de tu locura conmigo, tanto tu alegría como tu espontaneidad hicieron que cada momento a tu lado estuviera colmado de risas y felicidad, impregnándome de la mejor actitud para afrontar los retos académicos del día a día. Hoy siento que hasta en medio de tu partida me brindaste la fortaleza necesaria para culminar esta fase. El cielo ganó una estrella formada de adrenalina, mientras yo aquí te estaré eternamente agradecida por haber contado con tu amor y tu apoyo durante esta etapa de mi vida.*



## Agradecimientos

Primeramente agradezco a Dios por sus infinitas bendiciones y por darme la fuerza para superar todos los obstáculos y dificultades que se han presentado en mi vida.

A mi familia por todo su cariño y comprensión, en especial a mi padre por ser un ejemplo de lucha, disciplina y trabajo constante, a mi madre por su paciencia, su entrega y su gran amor, a mi hermano que desde el cielo ilumina cada uno de mis pasos y a mi sobrino por ser mi gran motivación para cumplir mis sueños y hacer posibles los suyos.

Al grupo de investigación “Conservación, Mejoramiento y Utilización del Ganado Criollo Hartón del Valle y Otros Recursos Genéticos Animales en el Sur Occidente Colombiano” por su confianza y apoyo durante todo mi proceso académico.

Al profesor Rómulo Campos, por haberme dado un lugar en el grupo y entregarme la confianza del laboratorio, pero ante todo por el conocimiento que he adquirido en el área de investigación a su lado desde mi pregrado hasta ahora como tutor de mi tesis de maestría, mil gracias por toda la paciencia, el apoyo y la comprensión.

A Leónidas Giraldo y Erika Hernández por toda su colaboración en campo durante un año de muchas madrugadas y de pasar horas frente a cada animal del experimento, por otras cosas incluidos trámites administrativos y demás, pero principalmente gracias por compartir mis alegrías, tristezas y preocupaciones durante este proceso.

A la vicerrectoría de investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira por la financiación del proyecto.

A la familia Bravo por permitir el desarrollo de mi trabajo en la finca ganadera “EL HATO”, en especial a doña Martha y don Edgar por siempre ayudarnos con la mejor disposición.

A Gustavo Tovar, por su gran colaboración y paciencia en todo lo referente a la consecución y el manejo de los kits y demás materiales de laboratorio.

A Mauricio Vélez por su apoyo en el análisis estadístico de mi proyecto.

A Juan David Morales por su colaboración.

Finalmente y no menos importante, a mis amigas Paula, Jazmín, Jovis, Ángela y Laura por su apoyo incondicional y comprensión a pesar de la distancia o las múltiples ocupaciones.





## Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar dos tratamientos de suplementación mineral y vitamínica frente a la dinámica insulínica y cetosis durante el periodo de transición de vacas de alta producción de leche bajo condiciones de trópico, a través de indicadores metabólicos. Veintiún animales fueron distribuidos en tres grupos, T1: control, T2: suplementación yodada y T3: suplementación mineral mixta y vitamínica. El periodo experimental estuvo comprendido entre el día 30 preparto y el día 105 posparto. Se realizó toma de muestras de sangre, leche y orina. Se obtuvieron variables que permitieron analizar el metabolismo energético, proteico, mineral, hormonal y hemático. Se calcularon índices propuestos para identificar resistencia insulínica. Los grupos con suplementación evidenciaron una menor movilización de reservas corporales y mayor concentración de hormonas con función homeostática. La producción de leche y la respuesta inmune no fueron afectadas por los tratamientos.

**Palabras clave:** Metabolismo, bovinos, periodo de transición, BEN, nutrición

## Abstract

The aim of this study was to evaluate two treatments: mineral and vitamin supplementation against insulin and ketosis dynamics during the transition period of high-milk yield cows under tropical conditions, through metabolic indicators. 21 animals were assigned to three groups: T1: control, T2: iodine supplementation and T3: mixed mineral and Vitamin supplementation. Blood, milk and urine samples were collected 30 days before expected calving until 105 days in milk. Metabolites from energy, protein, mineral and hormonal metabolism were analyzed. Insulin activity was calculated using different mathematical indexes based on blood glucose, insulin, NEFA and BHB concentrations. Supplemented groups demonstrated lower mobilization of body reserves and higher concentration of hormones that play important homeostatic functions in the body, while milk production and immune responses were not affected by treatments.

**KEYWORDS:** Metabolism, bovines, transition period, NEB, nutrition

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Lista de graficas .....</b>	<b>XV</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Problema de estudio .....</b>	<b>5</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Revisión de literatura .....</b>	<b>7</b>
1.1 Período de Transición .....	7
1.2 Balance Energético Negativo .....	9
1.3 Metabolismo Lipídico en el Período de Transición.....	11
1.3.1 Cetosis en el Período de Transición.....	13
1.4 Insulina: Hormona Metabólica .....	16
1.4.1 Resistencia Insulínica .....	20
1.5 Consideraciones de Manejo Animal Durante el Período de Transición.....	25
1.6 Suplementación Mineral y Vitamínica Durante el Período de Transición .....	27
1.7 Efecto de las Condiciones de Trópico sobre la Producción de Leche.....	30
<b>2. Metodología .....</b>	<b>33</b>
<b>3. Resultados y Discusión .....</b>	<b>41</b>
3.1 Metabolismo Energético y Condición Corporal .....	41
3.2 Metabolitos Proteicos .....	49
3.3 Enzimas Hepáticas.....	55
3.4 Metabolismo Hormonal .....	59
3.5 Metabolismo Mineral .....	68
3.6 Análisis Sanguíneo: Hematocrito y Leucograma .....	75

XII	Suplementación mineral y vitamínica de vacas lecheras en trópico durante el periodo de transición: efecto sobre perfil metabólico, lácteo, hormonal y resistencia insulínica	
3.7	Producción y Composición de Leche .....	81
3.8	Índices de Resistencia Insulínica .....	84
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>91</b>
	<b>Anexos: Tablas con las variables analizadas durante el estudio .....</b>	<b>93</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>103</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Formación de cuerpos cetónicos en la mitocondria de los hepatocitos (Tomado de: Cartwright et al., 2012) .....	14
Figura 2. Vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAP-quinasas) (Tomado de: Olivares y Arellano, 2006). .....	18
Figura 3. Vía de la fosfatilinositol 3–quinasa (P13K) (Tomado de: Olivares y Arellano, 2006).....	18
Figura 4. Regulación de GLUT4 por la insulina (Tomado de: Olivares y Arellano, 2006).	19

## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Análisis bromatológico del pasto estrella y el concentrado suministrado a los animales experimentales. ....	34
Tabla 2. Metabolitos y hormonas analizados .....	37
Tabla 3. Significancia estadística asociada a los metabolitos energéticos .....	47
Tabla 4. Significancia estadística asociada a los metabolitos proteicos. ....	54
Tabla 5. Significancia estadística asociada a las enzimas hepáticas. ....	58
Tabla 6. Significancia estadística para las hormonas analizadas .....	67
Tabla 7. Significancia estadística para minerales séricos.....	73
Tabla 8. Significancia estadística asociada a bioquímica sanguínea.....	80
Tabla 9. Significancia estadística asociada a producción y composición de leche .....	83

## Lista de graficas

	Pág.
Gráfica 1.Comportamiento de los metabolitos energéticos para los tres grupos experimentales desde el día 30 antes del parto hasta el día 105 posparto, el día 0 corresponde al parto. Concentración sanguínea de A. Glucosa (mmol/L), B. NEFA (mmol/L), C. BHB (mmol/L), D. Concentración de cetonas en orina (mmol/L), E. Condición corporal (puntos).....	42
Gráfica 2. Comportamiento de los metabolitos proteicos para los tres grupos experimentales desde el día 30 antes del parto hasta el día 105 posparto, el día cero corresponde al parto. Concentración sanguínea de A. Proteína total (g/L), B. Albumina (g/L), C. Globulinas (g/L - Diferencia entre proteína total y albumina), D. Urea (mmol/L).	50
Gráfica 3. Comportamiento de las enzimas hepáticas para los tres grupos experimentales desde el día 30 antes del parto hasta el día 105 posparto. Concentración sanguínea de A. ALT (U/L), B. AST (U/L). ....	56
Gráfica 4. Comportamiento de las hormonas medidas para los tres grupos experimentales desde el día 30 antes del parto hasta el día 105 posparto. Concentración sanguínea de A. Cortisol (nmol/L), B. Triyodotironina (nmol/L), C. Tiroxina (nmol/L), D. Insulina (pmol/L).....	60
Gráfica 5. Comportamiento de los minerales para los tres grupos experimentales desde el día 30 antes del parto hasta el día 105 posparto. Concentración sanguínea de A. Calcio (mmol/L), B. Fósforo (mmol/L), C. Magnesio (mmol/L). ....	69
Gráfica 6. Porcentaje de eritrocitos y leucocitos en sangre. A Hematocrito, B. Linfocitos, C. Neutrófilos, D. Monocitos, E. Eosinófilos, F. Basófilos. ....	76
Figura 7. Producción y porcentajes de componentes en leche. A. Producción (L/vaca/día), B. Grasa, C. Proteína, D. Solidos no grasos, E. Lactosa. F. Minerales.....	82

Gráfica 8. Índices de sensibilidad insulínica. A. <sup>1</sup>Homeostasis Model Assessment (HOMA), B. <sup>2</sup>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI), C. <sup>3</sup>Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (RQUICKI), D. <sup>4</sup>Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index Beta-hidroxi butirato (RQUICKI BHB). .....84



# Introducción

La producción de leche en Colombia ha presentado un aumento sostenido en los últimos 30 años debido a la selección y mejoramiento genético en los animales de producción lechera, convirtiéndolos en animales especializados susceptibles a padecer diversos problemas metabólicos ya que las condiciones de manejo y los sistemas de nutrición no han evolucionado a la par de los programas genéticos (Galvis et al., 2005). Las enfermedades metabólicas representan pérdidas económicas para el productor, por la disminución de la producción de leche, el costo de los tratamientos, prácticas de manejo adicional en los animales afectados, y el aumento en las tasas de descarte (Gonzalez et al., 2011).

El final de la preñez y el inicio de la lactancia se caracterizan por importantes ajustes en el metabolismo de las vacas. Este intervalo de tiempo comprendido entre las 3 semanas anteriores y las 3 semanas posteriores al parto es conocido como periodo de transición (Cardoso, 2012).

Entre los cambios que se presentan durante el periodo de transición, se encuentra la alteración de la respuesta inmune como consecuencia de los cambios metabólicos y hormonales que se presentan durante esta etapa, generando un estado de inmunosupresión en los animales. Por tanto, el período de transición se caracteriza por la alta susceptibilidad a enfermedades infecciosas y desórdenes metabólicos, que adquieren gran importancia en ganado de alta producción de leche debido a la adaptación fisiológica para alcanzar un alto pico de producción (Cardoso, 2012).

El consumo de alimento también se ve influenciado por factores metabólicos y hormonales durante el período de transición, reduciéndose hasta en un 35% (Grummer, 1995 citado por Jaakson, 2012), lo cual sumado a los altos requerimientos de energía y de nutrientes (especialmente glucosa) para apoyar el crecimiento fetal e iniciar la síntesis

de leche en la glándula mamaria generan un desbalance entre la energía consumida y la energía requerida, por lo cual las vacas entran en balance energético negativo (BEN) (Jaakson, 2012). Balance que tiende a ser corregido mediante la actividad lipolítica.

Campos et al. (2012) discute que entre los procesos de adaptación metabólica en el periodo de transición se encuentra una compleja interacción entre la energía, los indicadores proteicos, las vitaminas y los minerales necesarios en las funciones estructurales y el sistema inmunológico.

Vacas con inadecuadas concentraciones de minerales como calcio, fosforo y magnesio en sangre van a presentar problemas metabólicos que van a afectar la actividad productiva y reproductiva en esta etapa. Los requerimientos de estos minerales dependen del peso del animal, la producción y composición de la leche, la raza y etapa fisiológica, además, de las condiciones climáticas de la zona donde se encuentren los animales (Campos et al., 2012).

Entre las vitaminas importantes en el periodo de transición se encuentran las pertenecientes al complejo B, ya que participan en forma de cofactores en diferentes reacciones bioquímicas del organismo y en el proceso de gluconeogénesis (Juchem et al. 2012).

En el período de transición los cambios endocrinos se hacen necesarios para preparar el animal para los procesos del parto y la lactogénesis, por ejemplo la concentración de la hormona de crecimiento en plasma aumenta mientras la de la insulina disminuye (Cardoso, 2012).

Otras hormonas también presentan cambios importantes en el periodo de transición, la progesterona y los estrógenos se reducen al parto, mientras la prolactina y los glucocorticoides aumentan (Cardoso, 2012).

El sistema endocrino tiene la función de sincronizar el desarrollo de la glándula mamaria, desencadenar la producción de leche y reactivar la función reproductiva del animal. En este proceso intervienen tres tipos de hormonas: las hormonas reproductivas estrógenos (E2), progesterona (P4), prolactina (PRL) y oxitocina (OT). Las concentraciones de estas hormonas cambian con el estado reproductivo y actúan directamente sobre la glándula mamaria participando en su desarrollo o coordinando la expulsión de la leche. Las hormonas metabólicas (hormona de crecimiento (GH), insulina, corticosteroides y

hormona tiroidea) regulan la respuesta a la ingesta de nutrientes y situaciones de estrés con efectos directos en glándula mamaria. El último grupo se refiere a las hormonas sintetizadas y secretadas por la misma glándula mamaria como la hormona de crecimiento (GH), proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), leptina y prolactina (PRL) (Neville et al., 2002).

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células  $\beta$  del páncreas, una de sus funciones principales es el papel desarrollado en el metabolismo energético durante el periodo de transición. La sensibilidad de los tejidos a la insulina juega un papel importante en la partición de nutrientes y regulación de la movilización de lípidos después del parto, además, es la hormona encargada de la captación de glucosa por los tejidos insulino-dependientes a través de la unión de ésta con sus receptores en la superficie de las células (Jaakson, 2012).

Al comienzo de la lactancia cuando las vacas se encuentran en BEN la acción de la insulina en las células disminuye en comparación con el periodo seco (Jaakson, 2012). Esta reducción puede darse ya sea por una menor secreción de insulina desde el páncreas, o por la inhibición del efecto metabólico o capacidad de respuesta a la hormona, presentándose una alteración metabólica conocida como Resistencia Insulínica (Schoenberg y Overton, 2010).

La insulina es una hormona de acción lipogénica, y por tanto, en periodos donde se presenta resistencia a esta hormona se inicia una fase lipolítica en el organismo con alta movilización de reserva grasa, que va a generar un aumento en los ácidos grasos no esterificados en el torrente sanguíneo (García et al., 2011). Estos ácidos grasos no esterificados son utilizados por el hígado como fuente de energía por oxidación completa a dióxido de carbono. Sin embargo, cuando la movilización de lípidos es excesiva, se saturan las vías de metabolización y se da una oxidación parcial a cuerpos cetónicos, además de formación y almacenamiento hepático de triglicéridos, lo cual predispone al animal a padecer los síndromes de cetosis o de hígado graso (García et al., 2011).

Se han encontrado informes de cetosis en sistemas especializados de producción lechera, la cual ocasiona reducción en la producción de leche, trastornos en la fertilidad y mayor riesgo de presentar otros problemas sanitarios; el manejo de estos animales durante el periodo final de la preñez y el inicio de la lactancia determinan la eficiencia del ciclo productivo de la lactancia (Noro et al., 2006).

El balance energético negativo en el periodo de transición ocasiona una movilización de las reservas de tejido adiposo para su corrección; esta situación fisiológica puede traducirse en cetosis, que unida a la posible resistencia insulínica producen un severo desequilibrio homeostático aun no dilucidado completamente, por lo cual, se hace necesario realizar investigaciones que permitan disminuir los efectos adversos del balance energético negativo y sus consecuencias.

Evaluar la respuesta metabólica a dos tipos de suplementación, mineral y vitamínica, durante el periodo de transición en vacas lecheras de alta producción en condiciones de trópico y su relación con la presentación de cetosis y resistencia insulínica.

## Problema de estudio

El balance energético negativo en animales seleccionados para producción lechera en condiciones de trópico, origina alteraciones metabólicas que afectan la homeostasis en el periodo alrededor del parto. Estas alteraciones están directamente relacionadas con el desempeño productivo de los animales durante toda la lactancia, y la posible presentación de enfermedades metabólicas, estas últimas conllevan a sensibles pérdidas económicas.

### Hipótesis

La movilización de reservas lipídicas durante el periodo de transición afecta la actividad de la insulina que favorece la presentación de cetosis.

Los metabolitos sanguíneos permiten diagnosticar cuadros de alteración metabólica, tales como cetosis y resistencia insulínica,

El uso de indicadores específicos del metabolismo energético permite la identificación temprana de cetosis y resistencia insulínica.

# Objetivos

## Objetivo General

Evaluar la respuesta metabólica a dos tipos de suplementación, mineral y vitamínica, durante el periodo de transición en vacas lecheras de alta producción en condiciones de trópico y su relación con la presentación de cetosis y resistencia insulínica.

## Objetivos Específicos

Identificar los metabolitos de mayor valor diagnóstico para la identificación temprana de la cetosis y la resistencia insulínica.

Conocer el efecto de la suplementación mineral y vitamínica frente a la producción de leche.

Estudiar el efecto de los suplementos sobre los componentes celulares del tejido sanguíneo, como método indirecto de conocer la posible resistencia inmune.

Analizar el efecto de la suplementación sobre indicadores del metabolismo proteico y de la función hepática.

Valorar la dinámica hormonal durante el periodo de transición en animales sometidos a dos tratamientos de suplementación mineral y vitamínica.

# **1. Revisión de literatura**

## **1.1 Periodo de Transición**

El principal objetivo de los ganaderos en la actualidad es ser altamente competitivos en el mercado cumpliendo con las normas de seguridad y los aspectos éticos que se presentan como exigencia creciente en los consumidores. Para esto, los ganaderos deben asegurar una alta productividad y baja incidencia de enfermedades de la producción en su hato (Ingvarsen, 2006).

En las últimas décadas, la presión de selección por animales de alta producción que permitió aumentar las ganancias en producción de leche y disminuir los costos de alimentación, generó a su vez, que los animales fueran menos eficientes en sus procesos reproductivos y más susceptibles a enfermedades metabólicas, y como consecuencia, los beneficios de una mayor rentabilidad por producción de leche se están viendo afectados por la reducción en la calidad de la leche, el aumento en los costos de tratamientos clínicos y por una alta tasa de reemplazo de animales dentro de los hatos (Ingvarsen, 2006).

En medio del avance generado en la productividad de los animales, se ha comenzado a prestar gran atención al periodo final de la gestación (2-3 semanas antes del parto) y al periodo inicial de la lactancia (2-3 semanas después del parto) considerándose como la fase clave en el ciclo de la lactancia, ya que en este intervalo de tiempo es donde ocurren los mayores cambios a nivel fisiológico, metabólico y nutricional, comúnmente es conocido como periodo de transición (Jouany, 2006).

Todas y cada una de las prácticas de manejo y nutrición que se realizan durante el periodo de transición pueden afectar directamente la incidencia de trastornos en el posparto, la producción de leche, la salud de la vaca y su cría, la fertilidad de las vacas, y como consecuencia la productividad y rentabilidad del hato lechero (Jouany, 2006).

Durante el periodo de transición se presenta una marcada reducción en el consumo de alimento y a su vez, un importante aumento en los requerimientos nutricionales, generando así, un desequilibrio entre la energía consumida y la energía requerida, lo cual lleva al animal a balance energético negativo (BEN) (Mulligan y Doherty, 2008).

La transición de estado fisiológico de la vaca de preñada no lactante a no preñada lactante requiere de un drástico ajuste de su metabolismo, generando un redireccionamiento de nutrientes para apoyar la síntesis de leche, proceso conocido como homeorresis (Bisonotto et al., 2012).

La reducción en el consumo de alimento probablemente puede ser causada por el aumento en la concentración de hormonas sexuales, la incipiente movilización de lípidos a partir de las reservas corporales del animal y la reducción en la capacidad del rumen debido al crecimiento fetal (Ingvarsen, 2006). Por otro lado, el aumento en los requerimientos de energía está determinado principalmente por la demanda de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos por parte de la glándula mamaria para producción de lactosa, grasa y proteínas de la leche, respectivamente. Además, se hace necesario un mayor flujo de calcio y otros minerales hacia este mismo tejido (Roche et al., 2012). Sumado a eso, también existe una demanda de nutrientes para crecimiento fetal al final de la gestación, y para el retorno a la actividad reproductiva en el posparto temprano (Chapinal et al., 2012).

En el desarrollo de la glándula mamaria, la rápida diferenciación del parénquima secretor, el intenso crecimiento de este tejido, el inicio de la síntesis y la secreción de leche, además de tener una alta demanda de energía también generan un alto consumo de oxígeno, con un aumento en la producción de derivados reactivos, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS) (Contreras et al., 2010).

En condiciones normales ROS son neutralizados por los mecanismos antioxidantes del organismo, pero en esta etapa, la producción de ROS excede la capacidad de defensa de los antioxidantes y se genera estrés oxidativo (Sharma et al., 2011), el cual es un factor causal de inmunosupresión en el periodo de transición que se ve exacerbado por la presencia de enfermedades metabólicas (Contreras et al., 2010).



El estado de inmunosupresión y de inflamación se presentan como factores asociados al periodo de transición (Esposito et al., 2014), siendo consecuencia de todos los cambios a nivel metabólico y endocrino en el animal, y de factores de estrés externos provocados por las prácticas de manejo como cambio de grupo de animales y cambio de alimentación (Mulligan y Doherty, 2008). Estas situaciones, sumadas al esfuerzo que realiza el animal en el momento del parto, hacen que el posparto temprano sea el momento de mayor riesgo de presentación de todo tipo de enfermedades (Mulligan y Doherty, 2008).

## **1.2 Balance Energético Negativo**

Durante el periodo de transición, las vacas lecheras entran en estado de balance energético negativo, determinado por tres razones: aumento en la demanda de energía al parto, disminución en el consumo de materia seca (CMS) antes del parto, y altos requerimientos de nutrientes en el posparto temprano para llegar al pico de producción (Ospina et al., 2010).

Ospina et al. (2010) discute que el requerimiento energético de una vaca aumenta de 1 Kg/día de glucosa durante el final de la gestación a 2.5 Kg/día durante las tres primeras semanas posparto, lo cual provoca una extensa movilización de tejido corporal, principalmente reservas grasas, pero también aminoácidos, minerales y vitaminas con la finalidad de suplir la demanda de nutrientes de la glándula mamaria para síntesis de leche (Binisotto et al., 2012).

La movilización de reservas corporales durante el periodo de transición está coordinada por la vía de señalización hormona de crecimiento (GH) – Insulina – Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) – Glucosa (Esposito et al., 2014).

La alteración del metabolismo energético puede generar resistencia insulínica, afectando principalmente los tejidos adiposo y muscular lo que incide en la captación periférica de glucosa y asegura mayor tránsito de este metabolito a la glándula mamaria. Además, se presenta disminución en la concentración de IGF-1, generando un aumento en la

concentración de GH que promueve la lipólisis y la gluconeogénesis en el hígado (Esposito et al., 2014).

En respuesta al balance energético negativo, se incrementa la lipólisis del tejido adiposo aumentando la liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo (Contreras y Sordillo, 2011). Los ácidos grasos son transportados en varias fracciones de lípidos entre las que se encuentran lípidos neutros (conformados por triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ésteres de colesterol), fosfolípidos y ácidos grasos no esterificados (NEFA, por su sigla en inglés) (Contreras et al., 2010). Los fosfolípidos y los lípidos neutros son transportados por las lipoproteínas de muy baja, baja y alta densidad (VLDL, LDL y HDL), mientras que los NEFA se movilizan unidos a la albúmina (Contreras y Sordillo, 2011). Los NEFA son los ácidos grasos de más rápida disponibilidad para ser utilizados como fuente de energía, al ser metabolizados por oxidación completa, oxidación parcial a cuerpos cetónicos, reesterificación a triglicéridos en el hígado o constituir la forma principal en la composición de grasa láctea (Contreras et al., 2010).

El hígado es uno de los principales órganos que actúan en el metabolismo de nutrientes, es el encargado de coordinar las modificaciones bioquímicas y morfológicas necesarias a través de la regulación de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos, la gluconeogénesis y la síntesis de triglicéridos. Sin embargo, la acumulación excesiva de lípidos en este órgano puede afectar sus funciones comprometiendo la producción de glucosa y generando un aumento en la respuesta inflamatoria (McCarthy et al., 2010).

La gravedad y duración del BEN ha sido estimado a través de los cambios observables en las reservas corporales, por medio de la calificación de condición corporal (CC) que en vacas de producción de leche se hace comúnmente de 1 a 5 puntos (Bisinotto et al., 2012).

La CC con que las vacas llegan al parto es un factor importante dentro del periodo de transición, existiendo una relación no lineal entre la CC al parto y la posterior producción de leche y actividad reproductiva. Animales que pierden más de un punto de CC en forma sostenida después del parto tienen mayor riesgo de presentar trastornos metabólicos que reducen la producción de leche (Adrien et al., 2012). Vacas que pierden más condición corporal durante los 65 días siguientes al parto tienden a ser anovulatorias al final del tiempo de espera voluntaria, disminuyendo las tasas de concepción y

aumentando el riesgo de pérdida de la preñez después de la primera inseminación posparto, lo cual está demostrando los altos requerimientos energéticos para el reinicio de la actividad reproductiva posparto (Bisinotto et al., 2012).

### 1.3 Metabolismo Lipídico en el Periodo de Transición

El periodo de transición se caracteriza por la movilización de reservas corporales que se presenta en diferentes tejidos, en especial en el tejido adiposo (Weber et al., 2013). Esta movilización es controlada por una adaptación tanto metabólica como endocrina en el organismo y es más pronunciada en vacas con alto mérito genético para producción de leche ya que las exigencias de la glándula mamaria son proporcionales al nivel productivo del animal (Weber et al., 2013).

La alta tasa de movilización de reservas conlleva al aumento en la concentración de ácidos grasos en el plasma (Gross et al., 2013). Estos ácidos grasos son transportados en el torrente sanguíneo por varias fracciones de lípidos, entre los que se encuentran lípidos neutros, fosfolípidos y NEFA. Los lípidos neutrales están compuestos por triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ésteres de colesterol (Contreras et al., 2010).

Los lípidos neutros y los fosfolípidos son transportados por lipoproteínas de baja, muy baja y alta densidad, conocidas bajo sus siglas del inglés LDL, VLDL y HDL respectivamente. Estas lipoproteínas permiten transportar los lípidos en solución acuosa, mientras que los NEFA pueden mantenerse en el torrente sanguíneo unidos con albumina, o una pequeña porción de estos pueden permanecer como monómeros libres (Contreras et al., 2010).

Los ácidos grasos libres que llegan al hígado son convertidos en Acetil-CoA en la mitocondria del hepatocito por medio del proceso de  $\beta$ -oxidación (Wathes et al., 2013). El acetil-CoA puede ser incorporado al ciclo de Krebs para la obtención de energía en forma de ATP; sin embargo, para esto es necesario el oxalacetato, el cual proviene de precursores glucogénicos como el propionato, acetato, glicerol o determinados aminoácidos. Durante el periodo de transición el oxalacetato es insuficiente por la falta de precursores glucogénicos, y por tanto el Acetil CoA no puede ingresar al ciclo de Krebs y

sufre una oxidación incompleta formando los tres cuerpos cetónicos, acetona, acetoacetato y betahidroxibutirato (Duque et al., 2011).

La acumulación de cuerpos cetónicos puede llevar al animal a un cuadro de cetosis tipo I (Noro y Barboza, 2012). Así mismo, puede presentarse reesterificación de los NEFA a triglicéridos, los cuales se almacenan en los hepatocitos y pueden ocasionar la formación de hígado graso (Weber et al., 2013).

La alteración en la homeostasis de los lípidos puede estar asociada a otros trastornos metabólicos como la resistencia insulínica por la función lipogénica de la insulina, y puede afectar la función inmune celular, mediante la modificación en la señalización intracelular asociada a la presencia de balsas lipídicas unidas a proteínas transmembranales, a la unión de receptores específicos tipo Toll, a la expresión génica y a la activación de factores de transcripción que inducen la apoptosis celular y la modificación en la composición de lípidos de las células inmunes, lo cual afecta directamente su actividad (Contreras et al., 2010).

La lipólisis de los tejidos periféricos en el periodo de transición es una importante fuente de energía para la glándula mamaria. Una importante cantidad de NEFA van directamente a este tejido mientras que una proporción de estos ácidos grasos van al hígado para ser sido metabolizados a cetonas (acetoacetato y betahidroxibutirato), y en esta forma también pueden direccionarse a la glándula mamaria como apoyo energético para la producción de leche (Loor, et al. 2013).

La mayoría de los lípidos que son captados por la glándula mamaria además de proveer a este tejido de energía también pueden ser destinados a la formación de la grasa láctea convirtiéndose en precursores de los ácidos grasos que aparecerán posteriormente en la leche (Loor, et al. 2013).

La captación de metabolitos lipídicos por parte de la glándula mamaria aumenta considerablemente en el inicio de la lactancia y disminuye al avanzar la preñez de las vacas, lo cual se ha relacionado con el gen de la lipoproteína lipasa, debido a que su patrón de expresión tiene un comportamiento muy similar al de la curva de lactancia, lo que ha llevado a vislumbrar el importante papel que juega esta enzima asociada al

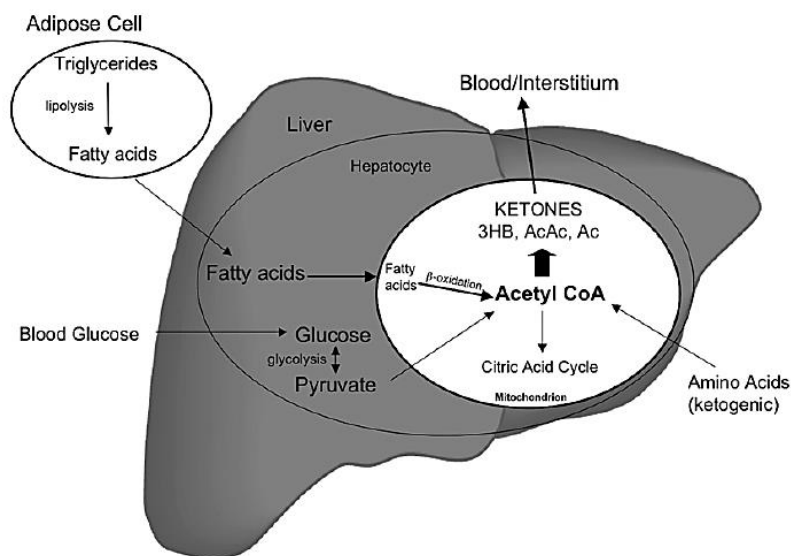
metabolismo lipídico en el mantenimiento de la síntesis de leche y en la captación de energía por parte de la glándula mamaria (Bionaz y Loor, 2008).

La captación de ácidos grasos por las células mamarias involucran mecanismos complejos y coordinados donde interactúan la expresión de múltiples genes en diferentes proteínas (Bionaz y Loor, 2008).

### **1.3.1 Cetosis en el Periodo de Transición**

La cetosis es un desorden metabólico de vacas lecheras de alta producción que se caracteriza por el incremento en las concentraciones de cuerpos cetónicos en sangre, orina y leche. Como consecuencia de la cetosis, se presenta una disminución en la producción de leche, el aumento en la incidencia y duración de patologías como desplazamiento de abomaso y metritis, el aumento del tiempo necesario para retornar a la actividad reproductiva y un mayor riesgo de que los animales sean sacrificados por descarte al comprometer su actividad productiva y reproductiva (Berge y Vertenten, 2014).

La cetosis ocurre cuando la movilización de grasa corporal es excesiva, se supera la capacidad del hígado para oxidar completamente los NEFA y se eleva la concentración de tres compuestos cetoácidos conocidos comúnmente como cuerpos cetónicos (figura 5). Los principales cuerpos cetónicos son beta-hidroxibutirato (BHB), acetoacetato (AcAc) y Acetona (Ac), que se encuentran distribuidos en la proporción de 70, 28 y 2%, respectivamente (Zhang et al., 2012). Entre ellos, el BHB es el predominante en los rumiantes, presentando una fuerte correlación entre su concentración y la concentración de AcAc. El aumento de las concentraciones de BHB puede explicarse por la estimulación de la lipólisis en el organismo, o por el consumo de ensilajes en mal estado que incrementan la absorción de butirato, lo cual es menos usual (Zhang et al., 2012).



**Figura 1. Formación de cuerpos cetónicos en la mitocondria de los hepatocitos (Tomado de: Cartwright et al., 2012)**

La cetosis en el periodo de transición ha sido atribuida principalmente a una alta demanda de glucosa y glucógeno como forma rápida de suministro de energía por la actividad gluconeogénica para compensar el balance energético negativo, que no puede ser cubierto por los aportes nutricionales directos, lo que ocasiona alteraciones bioquímicas y hormonales en el organismo, que conllevan a una severa lipomovilización en el organismo (Zhang et al., 2012).

El aumento en la concentración de cuerpos cetónicos en el posparto temprano como respuesta a la alta demanda de energía, se considera normal en vacas lecheras, pero su acumulación excesiva se ha considerado como un indicador de baja respuesta adaptativa en animales de alto rendimiento lechero (Duffield et al., 2009).

Noro y Barboza (2012) discuten que esta enfermedad metabólica se clasifica en dos formas: cetosis tipo I y cetosis tipo II. La cetosis tipo I se presenta entre la tercera y la octava semana posparto y se caracteriza por hipoinsulinemia, disminución en la concentración de glucógeno hepático, hipoglucemia, incremento en NEFA y cuerpos cetónicos en sangre. Por su parte, la cetosis tipo II se presenta en los dos primeras semanas posparto, y se caracteriza por hiperinsulinemia, resistencia a la insulina,

hiperglucemia, bajas concentraciones de BHB, con algunas excepciones de vacas que pueden presentar hipercetonemia, alta concentración de NEFA, y lipidosis hepática (Noro y Barboza, 2012).

La cetosis clínica presenta signos tanto nerviosos como digestivos, Noro y Barboza (2012) discuten que los signos nerviosos de la cetosis corresponden al 15% e incluyen salivación, masticación, andar tambaleante, incoordinación motora, ceguera, caminar en círculos, déficit propioceptivo, presión de la cabeza contra objetos, ceguera aparente, pica, salivación, hiperestesia, vocalización constante, temores moderados y tetania, mientras en su forma digestiva se presentan heces duras, disminución en el consumo de alimento, anorexia y caída en la producción de leche. La forma subclínica es la más frecuente, y se caracteriza por un incremento en los cuerpos cetónicos en sangre sin ningún síntoma clínico evidenciable, lo que hace su diagnóstico más complejo; se presenta sensible disminución en la producción de leche y aumento en la susceptibilidad a otras enfermedades (Berge y Vertenten, 2014). Esta forma de cetosis es caracterizada por niveles de BHB en suero entre 1,00 y 1,40 mmol/L (Suthar et al., 2013).

En Colombia no se encuentran estudios puntuales con determinaciones en patología clínica sobre los niveles de BHB que permitan caracterizar la enfermedad.

El BHB es el cuerpo cetónico predominante y más estable en los rumiantes, por tanto ha sido usado como el principal indicador de cetosis. Estudios basados en su concentración sérica han mostrado incidencia de cetosis subclínica entre el 26,4 y 55,7% desde el día 3 en leche hasta el día 16 en Norte América, y entre 11,2 a 36,6% para Europa entre los días 2 a 15 de lactancia (Iwersen et al., 2013).

Según Noro y Barboza (2012) la elevada movilización de NEFA ocasionada por el BEN o los cambios hormonales que acompañan al parto, son consideradas las principales causas de la patología conocida como hígado graso o lipidosis hepática, la cual hace referencia a la infiltración de grasa en el hígado. Por lo tanto a mayor cantidad de NEFA circulando en sangre mayor será la captación de este metabolito por el hígado aumentando el riesgo de que las vacas al inicio de la lactancia padezcan esta afección (Díaz et al., 2011).

La formación de hígado graso se da cuando se excede la capacidad del hígado para oxidar NEFA completamente hasta  $\text{CO}_2$  o parcialmente hasta cetonas, y entonces se da

la esterificación para formar triglicéridos que deben ser exportados del hígado como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), sin embargo, la capacidad de los rumiantes para liberar las VLDL es muy lenta presentándose la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (Grummer, 2008).

Las lesiones causadas por la infiltración de grasa en el hígado se encuentran típicamente en vacas de alta producción de leche al comienzo de la lactancia (Díaz et al., 2011).

No se han encontrado síntomas clínicos específicos que evidencien el trastorno metabólico de hígado graso, pero si se ha detectado que los animales que lo padecen son más susceptibles a presentar otras enfermedades como cetosis, mastitis, metritis, desplazamiento de abomaso y fiebre de leche, durante el periodo de transición (Ametaj, 2005, Díaz et al., 2011).

## **1.4 Insulina: Hormona Metabólica**

La insulina es una hormona secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas, compuesta de dos cadenas de péptidos, la cadena A y la cadena B, las cuales se unen por dos puentes disulfuro que se encuentran entre la posición 7 de las dos cadenas, y la posición 20 de la A y 19 de la B (Hayirli, 2006). La molécula de insulina está compuesta por 51 aminoácidos, donde 21 corresponden a la cadena A y 30 a la cadena B (Hayirli, 2006).

La insulina presenta pequeñas diferencias entre rumiantes y no rumiantes sobre el metabolismo de algunos nutrientes y en la magnitud de respuesta cuando se realiza su aplicación exógena (Hayirli et al., 2002). Sin embargo, la estructura química básica y las funciones determinantes son similares en la mayoría de mamíferos (humanos, bovinos, ovinos, porcinos, caballos, conejos y perros) (Hayirli, 2006). Las principales diferencias entre la molécula de insulina humana y la bovina son: en la cadena B la treonina situada en la posición 30 en humanos es sustituida por alanina en bovinos, y en la cadena A la treonina y la isoleucina de las posiciones 8 y 10 en humanos son reemplazadas por alanina y valina en la molécula bovina (Hayirli, 2006).



La insulina cumple funciones anabólicas en el organismo promoviendo la conservación de los nutrientes en sus diversas formas de almacenamiento, mediante la estimulación de procesos como la glucogénesis, lipogénesis, síntesis de glicerol, e inhibición de otros procesos como la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la lipólisis (Hayirli et al., 2002). En las vacas lecheras, la insulina es una hormona indispensable en la regulación del metabolismo de la glucosa, los lípidos y las proteínas (Winkelman y Overton, 2012).

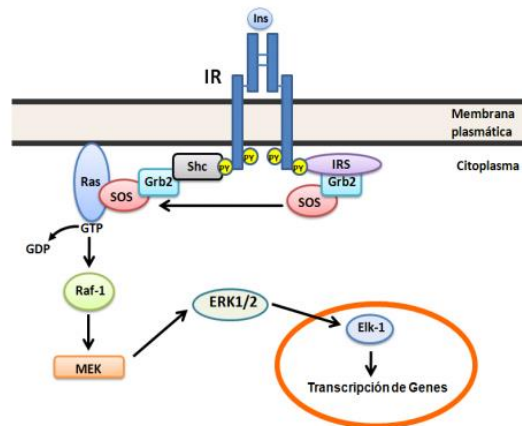
La acción de la insulina inicia con el acople de esta hormona a sus receptores que se encuentran en la membrana de las células (Zachut et al., 2013).

Cada receptor de insulina es un heterotetrámero compuesto por cuatro subunidades (unidas por puentes disulfuro): dos subunidades  $\alpha$  que se encuentran en el exterior de la membrana plasmática de las células y conforman el punto de encuentro directo con la insulina y dos subunidades  $\beta$  que tienen una parte extracelular, una transmembranal y una intracelular donde se encuentra el dominio tirosina-quinasa (Olivares y Arellano, 2006).

El encuentro de la insulina con las subunidades  $\alpha$  genera un cambio conformacional en estas estructuras, el cual es transmitido a las subunidades  $\beta$  en donde se desencadena un proceso de autofosforilación a partir de ATP que le permite activarse y estimular la actividad de la tirosina-quinasa (Zachut et al., 2013). Consecuente a este proceso, diferentes mensajeros secundarios intracelulares se propagan en una cascada de señalización dirigida por interacciones proteicas generando los diferentes efectos biológicos de la insulina (Hayirly, 2006).

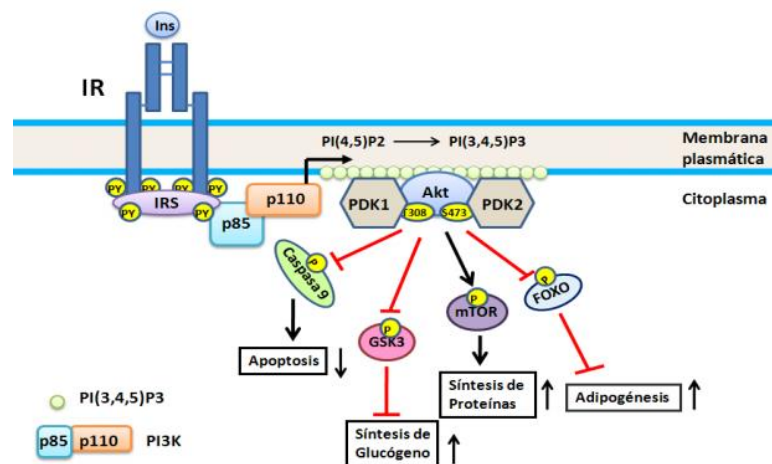
El encuentro de la insulina con su receptor estimula diferentes vías de transducción, entre las cuales se destacan como las de mayor efecto biológico en el organismo la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la vía de las quinasas activadas por mitógenos conocida como MAP-quinasas (Olivares y Arellano, 2006).

Por medio de la vía MAP-quinasas, la insulina participa en la regulación de la síntesis proteica (Figura 1), lo cual se da después de una serie de conexiones entre diferentes proteínas intermediarias que se estimulan una a una hasta llegar al núcleo de la célula modulando la transcripción de genes específicos (Hayirly, 2006; Olivares y Arellano, 2006).



**Figura 2. Vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAP-quinasas) (Tomado de: Olivares y Arellano, 2006).**

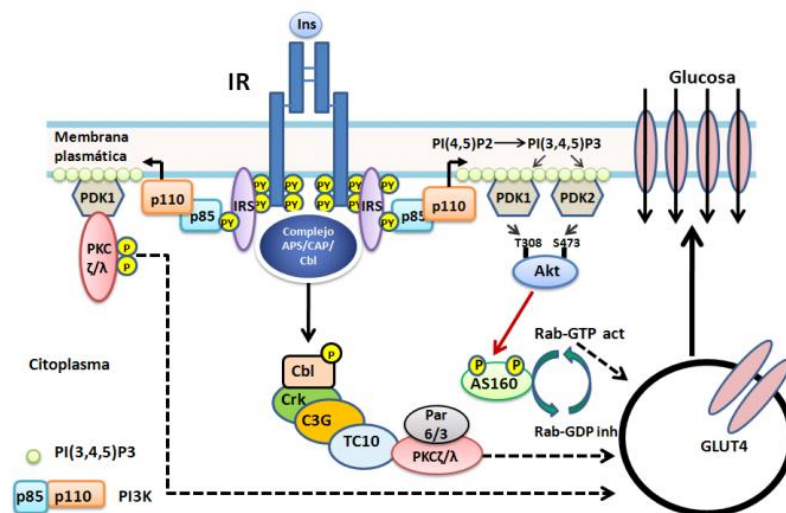
La vía de la fosfatidilinositol 3–quinasa (P13K) se forma de una cascada de reacciones que se da tras la activación de dos moléculas mensajeras que generan la acción de proteínas específicas que promueven el desarrollo de determinado proceso biológico como se muestra en la figura 2, teniendo en cuenta que esta es la vía por la cual la insulina ejerce la mayoría de funciones asociadas al metabolismo energético (Hayirly, 2006, Olivares y Arellano, 2006).



**Figura 3. Vía de la fosfatilinositol 3–quinasa (P13K) (Tomado de: Olivares y Arellano, 2006).**

La vía P13K (como vía principal) y la CAP & Cbl (como vía secundaria) son de gran importancia en el metabolismo de la glucosa, debido a que por estas vías se da la translocación del transportador de glucosa GLUT4 desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática, permitiendo la entrada de glucosa a las células del músculo y el tejido adiposo (Zachut et al., 2013). Este proceso se da en medio de las siguientes fases:

- La insulina se une a un receptor específico ubicado en la superficie de la célula con la finalidad de inducir una señal
- en respuesta a esa señal las vesículas que contienen los GLUT4 son trasladados a la membrana plasmática
- Se da la difusión de las vesículas con la membrana celular, comunicando los transportadores de la glucosa con el exterior de la célula para permitir la entrada de la glucosa al citoplasma
- Al final se da la separación de la insulina de su receptor y los transportadores de glucosa regresan a la misma posición intracelular en la que se encontraban (Zachut et al., 2013).



**Figura 4. Regulación de GLUT4 por la insulina (Tomado de: Olivares y Arellano, 2006).**

La insulina participa en el control homeorrético que se presenta en el periodo de transición, desempeñando un papel fundamental en los ajustes metabólicos que se presentan en todos los tejidos del cuerpo (Zachut et al., 2013) y que permiten el direccionamiento del metabolismo hacia un estado catabólico que favorece el flujo de nutrientes para el feto y la glándula mamaria (Jaakson et al., 2013).

Durante el periodo de transición la capacidad de respuesta y la sensibilidad a la insulina se disminuyen en los tejidos extra hepáticos (Jaakson et al., 2013), a la vez que la concentración de la hormona en sangre también se reduce. Como resultado se presenta una marcada reducción en la oxidación de glucosa en el organismo de la vaca, asegurando el direccionamiento de este metabolito a la glándula mamaria para la formación de leche (Zachut et al., 2013).

Además de intervenir en el metabolismo de la glucosa, la insulina también juega un papel clave en el metabolismo lipídico posparto, ya que cumple una función lipogénica en el organismo, y cuando se disminuye su concentración en sangre, sumado a la pérdida de sensibilidad de los tejidos extra hepáticos a esta hormona, se genera un estado lipolítico, con alta liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo a partir del tejido adiposo, favoreciendo también el flujo de estos metabolitos para crecimiento fetal y formación de leche (Jaakson et al., 2013).

### **1.4.1 Resistencia Insulínica**

La resistencia insulínica se define como el estado en el que un nivel fisiológico de insulina produce una menor respuesta biológica que la normal, esto es, es necesaria una mayor cantidad de insulina para producir una respuesta normal en el organismo (Kahn, 1978 citado por Jaakson, 2012).

La resistencia insulínica puede ser evaluada por la capacidad de respuesta a la hormona (respuesta de la insulina a la glucosa), la sensibilidad a la hormona (respuesta del tejido a la insulina) o ambas (Kerestes, 2010).

La disminución en la sensibilidad a la insulina hace referencia a que se necesita más concentración de la hormona para producir una respuesta biológica, mientras que la

disminución en la capacidad de respuesta quiere decir que una concentración fisiológica de insulina genera una respuesta más débil de lo normal (Jaakson, 2012).

En mamíferos, especialmente en vacas lecheras se ha propuesto un concepto basado en los efectos metabólicos que causa en estos animales en el período de transición, planteando que la resistencia insulínica se da con el fin de preservar la glucosa para crecimiento fetal y producción de leche, y además promover la movilización de lípidos para suplir de energía al organismo (Hayirli, 2006).

En esta etapa la captación de glucosa por los tejidos esquelético, muscular y adiposo se reduce considerablemente. Las causas de esta reducción se han atribuido a la reducción en la concentración de GLUT4 (transportador de glucosa dependiente de la insulina) hasta en un 40% durante las primeras cuatro semanas posparto en comparación con la lactancia tardía y el periodo seco, sugiriendo una regulación postranscripcional en el ARNm de este transportador que favorecería la disminución en la sensibilidad de los estos tejidos a la insulina (Koster y Opsomer, 2013).

Entre los factores que podrían estar involucrados en la resistencia insulínica se encuentran: deficiencia en la producción de insulina por disfunción en las células  $\beta$  del páncreas, defectos en los receptores de insulina, baja concentración de GLUT4, y baja producción de glucosa hepática (Hayirly, 2006).

Kerestes et al. (2009) menciona que la resistencia insulínica juega un papel fundamental en la adaptación al BEN posparto y en la patogénesis de algunas alteraciones relacionadas con el BEN, tales como cetosis, acumulación excesiva de lípidos en el hígado, desplazamiento de abomaso, formación de quistes ováricos y laminitis.

Al presentarse resistencia a la insulina en el tejido adiposo, se genera una alta movilización de reservas corporales aumentando la concentración de NEFA en plasma, lo cual permite suplir parcialmente de energía al organismo durante la lactancia temprana. Sin embargo, cuando esta movilización se hace excesiva se desarrollan diversos problemas metabólicos, tales como cetosis, hígado graso, mayor depresión en el consumo de materia seca derivada de la liberación de leptina, consumo que para ese momento ya se encuentra reducido por los procesos de adaptación al nuevo estado fisiológico, todo lo cual lleva a agravar el BEN en el período de transición (Schoenberg y Overton, 2010).

Jaakson et al. (2013) discute que la condición corporal puede estar asociada a la presentación de resistencia insulínica, donde vacas con una alta o baja condición corporal son más susceptibles a desarrollar este síndrome que animales con una CC moderada, lo cual puede explicarse así: vacas delgadas con problemas de subnutrición tendrán una menor secreción pancreática de insulina, mientras que vacas gordas presentarán hiperinsulinemia al parto, y como efecto a largo plazo evidenciaran excesiva concentración de leptina, originando la depresión en el consumo de alimento que agravará el estado de BEN.

Para determinar la presentación de resistencia insulínica se han implementado diversas técnicas que han sido inicialmente aplicadas en humanos y su uso se ha extendido a animales de producción, especialmente vacas lecheras.

La técnica de Clamp hiperinsulinémico-euglicémico es considerada como una de las pruebas de mayor confiabilidad para el diagnóstico de resistencia insulínica en humanos y animales. Esta prueba corresponde a la infusión intravenosa de insulina a una velocidad constante, acompañada de administración continua intravenosa de glucosa a una tasa variable, para identificar la relación entre la concentración elevada de insulina con el mantenimiento de la glucosa en su nivel metabólico normal (Winkelman y Overton, 2012). En esta prueba se obtienen muestras de sangre en intervalos de 5 a 10 minutos por 2 horas, con la finalidad de mantener la euglicemia (Koster y Opsomer, 2013). En esta prueba se pueden presentar inconvenientes en la interpretación de los datos por la magnitud en la infusión de glucosa, ya que la euglicemia es mantenida mediante una aplicación constante de este metabolito y la cantidad en cada aplicación es adaptada empíricamente para retornar al valor basal en sangre (Winkelman y Overton, 2012; Koster y Opsomer, 2013).

La prueba de tolerancia a la insulina conocida bajo sus siglas en inglés ITT, es un método mediante el cual se mide la sensibilidad a la insulina con la aplicación de una concentración conocida de la hormona y la medición de los niveles de glucosa, antes y después de la aplicación (Lee et al., 2012). El principal riesgo en la aplicación de esta técnica es la hipoglicemia causada en las vacas, la cual podría generar mecanismos contrarreguladores que llevarían a confundir la estimación de la sensibilidad insulínica, a

la vez que si se llega a una hipoglicemia severa se tendrían efectos secundarios como daños neuronales y cardiovasculares (Koster y Opsomer, 2013).

La prueba de tolerancia a la glucosa GTT (siglas del inglés) consiste en la infusión intravenosa de glucosa en concentraciones conocidas, con la subsecuente toma de muestras de sangre en determinados intervalos de tiempo para determinar las concentraciones de glucosa e insulina (Jaakson et al., 2013). La dificultad de esta técnica se presenta en el análisis de los resultados, debido a que son muchas las variables endógenas que estarían afectando los niveles de glucosa e insulina en plasma como por ejemplo el estrés al que se verían sometidos los animales durante la prueba. Por tanto, no se podría determinar si la tasa de desaparición de glucosa en plasma es debido al aumento en la utilización de la glucosa que se suministró vía intravenosa, o si es producto de la disminución en la producción endógena de glucosa por parte del hígado y del riñón (Hayirli, 2006). Este tipo de pruebas también han sido aplicadas en animales en condiciones de pastoreo como es el caso del trabajo realizado por Cucunubo et al. (2013), sin embargo no se encuentran reportes de trabajos de este tipo realizados bajo condiciones de trópico.

Las pruebas mencionadas anteriormente en las cuales se reta al organismo a concentraciones establecidas ya sea de glucosa o insulina vía sanguínea, han sido ampliamente aplicadas en medicina humana. Sin embargo, su uso en animales, específicamente en vacas lecheras en periodo de transición ha sido limitado. Esto debido a que son pruebas invasivas que requieren condiciones de manejo especiales en las cuales los animales estarían sometidos a periodos de estrés muy largos. Esta no sería una condición favorable en estado de finalización de preñez o inicio de lactancia, pues además de afectar los resultados en concentración de glucosa, se podría afectar el momento de parto o la producción de leche como respuesta a las condiciones de estrés (Jaakson et al., 2013).

Como una alternativa a estas técnicas que requieren el desarrollo de complejos protocolos, se han planteado modelos estimativos para evaluar la sensibilidad a la insulina reduciendo al mínimo la cantidad y el tiempo en la toma de muestras a la vez que se obtiene la mayor cantidad de información (Gellrich, 2012). Estos modelos se han desarrollado para su aplicación en medicina humana, pero su uso ha sido extrapolado en la producción animal con algunas adaptaciones (Gellrich, 2012, Jaakson et al., 2013,

Holtenius y Holtenius, 2007). Los modelos son conocidos también como índices de sustitución para resistencia insulínica y entre los más usados actualmente se encuentran el índice HOMA y el método RQUICKI (Koster y Opsomer, 2013).

El índice HOMA (por sus siglas en inglés provenientes del nombre “Homeostasis Model Assessment”) es un procedimiento simple, poco invasivo, que permite mediante un cálculo precisar un valor en la determinación de resistencia insulínica, basado en el producto de las concentraciones de insulina y glucosa medidas en una única muestra de sangre (Kusenda, 2010).

El RQUICKI (por sus siglas en inglés provenientes del nombre “Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index”) es un método que implica la valoración del balance energético, basándose en las concentraciones de glucosa, insulina y ácidos grasos libres. En este método se debe tener en cuenta que se calcula la sensibilidad a la insulina y por lo tanto entre mayor sea el valor del RQUICKI menor será la resistencia insulínica (Holtenius y Holtenius, 2007). Este método fue adaptado del método QUICKI (por sus siglas en inglés “Quantitative Insulin Sensitivity Check Index”) desarrollado por Katz et al. (2000) donde tan solo se tenían en cuenta las concentraciones de glucosa e insulina (Gellrich, 2012). Adicionalmente a estos dos modelos se ha adicionado el RQUICKI<sub>BHB</sub> donde se tiene en cuenta también la concentración de beta-hidroxibutirato (Koster y Opsomer, 2013).

Las fórmulas asociadas a los modelos mencionados anteriormente son:

$$\text{HOMA-IR} = [\text{glucosa (mmol/ml)} \times \text{insulina (mU/ml)}] / 22.5$$

$$\text{QUICKI} = 1 / [\log \text{glucosa (mg/dl)} + \log \text{insulina (mU/ml)}]$$

$$\text{RQUICKI} = 1 / [\log \text{glucosa (mg/dl)} + \log \text{insulina (mU/ml)} + \log \text{NEFA (mmol/l)}]$$

$$\text{RQUICKI}_{\text{BHB}} = 1 / [\log \text{glucosa (mg/dl)} + \log \text{insulina (mU/ml)} + \log \text{NEFA (mmol/l)} + \log \text{BHB (mmol/l)}]$$

Koster y Opsomer (2013) plantean que valores bajos en HOMA-IR son indicadores de menor resistencia insulínica en el animal, mientras que para QUICKI, RQUICKI, y RQUICKI<sub>BHB</sub>, valores bajos determinan una mayor resistencia insulínica.



## 1.5 Consideraciones de Manejo Animal Durante el Periodo de Transición

Durante el periodo de transición la vaca se encuentra en una fase crítica de adaptación donde busca estabilizar los mecanismos de control homeostáticos en el organismo, a la vez que el cambio de estado de no lactante a lactante involucra procesos homeorréticos que suponen una serie de cambios en el metabolismo (Lean et al., 2013).

La adopción de prácticas de manejo animal ha sido identificada como la principal forma de prevención de alteraciones metabólicas durante el periodo de transición (Kashfi et al., 2011). La implementación de prácticas simples y de bajo costo para el manejo nutricional preparto y posparto, ha permitido disminuir la presentación de enfermedades que generan altos costos en tratamiento, pérdidas en la producción del leche y demoras en el inicio de la actividad reproductiva (Kashfi et al., 2011).

La interpretación de los procesos metabólicos ha evolucionado progresivamente con el pasar de los años, y actualmente se ha identificado que estos procesos no trabajan en forma independiente sino que se encuentran íntimamente vinculados, y por tanto la falla en uno de estos inevitablemente afecta el metabolismo global del animal (Lean et al., 2013). Consecuente a esto, teniendo en cuenta la estrecha relación entre nutrición y metabolismo, el concepto de alimentación también evoluciona con un enfoque integrado que busca principalmente la optimización de los siguientes procesos en el periodo de transición: metabolismo del calcio, metabolismo energético, metabolismo proteico, la función inmune y la función ruminal (Lean et al., 2013).

Las consideraciones de manejo comúnmente utilizadas en el periodo de transición que buscan optimizar esos procesos, se encuentran:

**Consumo de materia seca:** Diferentes factores pueden influir en el consumo de alimento y agravar el BEN, entre los factores comunes la digestibilidad y palatabilidad del alimento, forrajes con alto contenido de fibra detergente neutra (FDN) afectaran el consumo de alimento, así mismo la relación forraje: concentrado puede tener alto impacto en el consumo (Grummer et al., 2010).

**Formación de grupos de animales:** con esto se permite un mayor control sobre la dieta si se hace por mérito productivo, o permite también, la distribución de las vacas en grupos diferentes entre las dominantes y las subordinadas, o las novillas, con la finalidad de que todas las vacas tengan acceso al alimento (Coonen et al., 2011).

**Condición corporal:** Animales con elevada condición corporal (superior a 3,75), presentan un menor consumo de alimento en el periodo de transición y por lo tanto movilizan más reservas corporales que vacas con condición corporal moderada, por tanto vacas gordas serán animales en alto riesgo de padecer cetosis al inicio de la lactancia (Grummer et al., 2010).

**Suministro de Glicerol y propilenglicol:** Estos productos son utilizados en la prevención y tratamiento de cetosis, el glicerol es fermentado por los microorganismos del rumen a ácidos grasos volátiles, que son absorbidos e integrados en la vía glucogénica (Lomander et al., 2012), por su parte el propilenglicol proporciona sustrato para la gluconeogénesis, favoreciendo el aumento de glucosa en plasma (Kashfi et al., 2011).

**Suplementación de Colina:** Este compuesto participa en la prevención de la formación de hígado graso, ya que favorece la salida de los triglicéridos del hígado, al participar en la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad y en su excreción al torrente sanguíneo (Lean et al., 2013).

Las consideraciones mencionadas muestran algunas opciones de manejo aplicadas durante el periodo de transición. Principalmente se busca disminuir los efectos negativos del BEN. Las prácticas de manejo y suplementación que se realizan durante este periodo dependen de las condiciones inherentes al sistema de producción que se maneja en cada finca y pueden variar dependiendo del clima, la topografía, la disponibilidad de personal y la capacidad económica del productor (Kashfi et al., 2011; Coonen et al., 2011).

## 1.6 Suplementación Mineral y Vitamínica Durante el Periodo de Transición

El periodo de transición afecta considerablemente la homeostasis mineral, la translocación hacia el feto y el inicio de la producción lechera, genera cambios en la dinámica de los principales minerales estructurales y regulatorios.

Los minerales son sustancias inorgánicas, presentes en todos los tejidos y fluidos corporales, son necesarios para el mantenimiento de diferentes procesos fisicoquímicos esenciales y se clasifican en macrominerales (calcio, fósforo, sodio y cloruro) y microminerales (hierro, cobre, cobalto, potasio, magnesio, yodo, zinc, manganeso, molibdeno, fluoruro, cromo, selenio, y azufre), donde los macro son necesarios en cantidades mayores a 100 mg/Kg de PV, y los micro en cantidades menores a 100 mg/Kg de PV (Soetan et al., 2010). Existe una tercera categoría que incluye los elementos ultra traza (boro, silicio, arsénico y níquel), (Soetan et al., 2010).

Las principales funciones de los minerales en el metabolismo animal son estructurales, fisiológicas, catalíticas y regulatorias (Suttle, 2010).

Algunos de los minerales con mayor actividad durante el periodo de transición son el yodo (I), el fósforo (P), el calcio (Ca), el selenio (Se) y el Zinc (Zn), los cuales deberían ser suplementados por su limitada oferta o alta demanda metabólica.

Estructuralmente, Ca y P son requeridos en mayor cantidad que otros minerales en el ganado lechero, alrededor del 99% de Ca y el 80% de P se encuentran en los huesos y dientes, mientras que el resto se encuentra cumpliendo funciones fisiológicas en el organismo, además de hacer parte de los componentes de la leche y el plasma sanguíneo, la deficiencia de estos minerales reduce el apetito, la producción de leche, la eficiencia reproductiva, el aprovechamiento del alimento, y aumenta la incidencia de enfermedades metabólicas (NRC, 2001 citado por Begum et al., 2009).

Durante el periodo de transición se desarrolla estrés oxidativo debido a la alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se da por la alta demanda metabólica que se presenta al final de la preñez, el parto y el inicio de la lactancia, todo esto conduce a la disfunción en la respuesta inflamatoria de los animales pues se ven comprometidas las

células inmunes, lo cual se convierte en un factor predisponente en la presentación de diversas enfermedades como metritis y mastitis (Sordillo, 2013).

El selenio (Se) actúa como agente antioxidante permitiendo reducir el estrés oxidativo que se presenta durante esta etapa fisiológica, ya que hace parte de la enzima glutatión peroxidasa que se encarga de destruir los radicales libres en el citoplasma (Calamari et al., 2011). Además, se ha encontrado una fuerte relación entre selenio y la regulación de las hormonas tiroideas (Guyot et al., 2011). La deficiencia de Se ha sido asociada con inmunosupresión y problemas reproductivos (Bicalho et al., 2014).

El cinc (Zn) se encuentra integrado a la mayoría de sistemas enzimáticos, participa en la síntesis de proteínas, el metabolismo de carbohidratos y la mayoría de reacciones bioquímicas del organismo, así mismo ayuda al mantenimiento de la piel, el tejido epitelial, y la glándula mamaria debido a su papel en la división y síntesis de proteínas, la deficiencia de este mineral durante el inicio de la lactancia conduce a baja calidad en la leche por alto conteo de células somáticas y aumento en la incidencia de mastitis (Sobhanirad et al., 2010).

El yodo (I) ha sido reconocido como el mineral que en su deficiencia causa una anomalía clínica fácilmente reconocible, la hipertrofia de la glándula tiroides, conocida comúnmente como Bocio (Suttle, 2010). La deficiencia de I se ha asociado en vacas con presentación de abortos, muerte fetal, o terneros que nacen débiles (Guyot et al., 2011). La principal función del yodo es ser constituyente de las hormonas tiroides, las cuales tienen un papel termorregulador, aumentan la respiración celular y la producción de energía, cumplen múltiples funciones en el metabolismo intermediario, el crecimiento, la función muscular, la función inmunológica y la circulación, además interactúan con otras hormonas como la insulina, la hormona de crecimiento y la corticosterona, promoviendo la síntesis de leptina en el tejido adiposo (Suttle, 2010).

Las vitaminas del complejo B son nutrientes indispensables en los mamíferos, incluidos los rumiantes, ya que participan como cofactores en diferentes ciclos metabólicos, como la gluconeogénesis y la regeneración de donantes de grupos metilo (Juchem et al., 2012).

Los ruminantes tienen la capacidad de cubrir los requerimientos de estas vitaminas por síntesis microbiana en el rumen, sin embargo, con el aumento en producción de leche que se ha producido en los últimos 50 años, los requerimientos nutricionales de estas vacas aumentaron también, no obstante, la capacidad de síntesis ruminal de estas vitaminas no ha cambiado y por lo tanto se han encontrado indicios de deficiencia de vitaminas del complejo B en vacas de alta producción de leche (Sacadura et al., 2008).

Diferentes estudios han mostrado que la suplementación de vitaminas del complejo B en forma individualizada no evidenció mayores resultados en comparación con la suplementación de varias de estas vitaminas a la vez, por lo que se sospecha que algunas pueden trabajar de forma interdependiente, como cofactores en la misma vía metabólica (Sacadura et al., 2008). Se ha encontrado que la suplementación de vitaminas en la lactancia temprana ha generado efectos positivos sobre la producción y composición de leche, así como en condición corporal, en reproducción no se han ampliado trabajos que permitan ver sus efectos, sin embargo, en otros mamíferos se ha encontrado que la deficiencia de estas vitaminas disminuye la tasa de concepción y aumenta el riesgo de pérdida de la preñez (Juchem et al., 2012).

Entre las vitaminas más importantes del complejo B se encuentra la B12, de la cual son dependientes dos enzimas en ganado lechero, una es la metionina sintetasa, la cual transfiere un grupo metilo para la regeneración de metionina y tetrahidrofolato, y la otra es la metilmalonil-CoA que participa en el ciclo de Krebs y la gluconeogénesis (Akins et al., 2013). Adicional a la vitamina B12, se encuentra la vitamina B3 conocida comúnmente como Niacina, la cual ha sido ampliamente usada en la prevención de cetosis debido a que se le ha atribuido la capacidad metabólica de detener la movilización de NEFA y generar aumento en la concentración de glucosa, con evidencia de menores concentraciones de NEFA y colesterol en sangre, lo cual se explica por la modificación en la síntesis y excreción de lipoproteínas hepáticas (Sacadura et al., 2008; Kashfi et al., 2011).

## **1.7 Efecto de las Condiciones de Trópico sobre la Producción de Leche**

En ecosistemas tropicales, la producción de leche implica un continuo desafío técnico, determinado por las difíciles condiciones ambientales, sanitarias y la poca rusticidad de las razas especializadas. Por tanto, los animales se ven obligados a asumir un alto gasto energético para lograr la adaptación a temperaturas y humedades críticas, reflejándose en problemas nutricionales y enfermedades metabólicas que elevan los costos de producción y generan un menor rendimiento en leche durante la lactancia (Campos et al., 2007).

Ceballos et al. (2004) plantea que Colombia, como país tropical, sustenta la producción de leche en trópico bajo con sistemas de producción doble propósito con razas de origen europeo, mientras que en el trópico alto se sustenta en lecherías especializadas con ganado Holstein, principalmente. La producción de leche en el país ha tenido un crecimiento significativo durante las últimas décadas, lo cual se ha visto acompañado de un incremento en la incidencia de enfermedades metabólicas en los sistemas lecheros (Campos et al., 2007).

Las dificultades asociadas a las condiciones medioambientales del trópico han afectado la industria láctea debido a las pérdidas económicas y la reducción en la producción de leche lo cual afecta especialmente a los pequeños productores (Ceballos et al., 2004).

Los sistemas de producción lecheros en el trópico son generalmente semi-intensivos, y se basan en el manejo de praderas con gramíneas como su principal fuente alimenticia. Las explotaciones lecheras en pastoreo debe enfrentar limitantes ambientales como los efectos del clima sobre los forrajes y los animales, y la presencia de parásitos, sumado a los problemas socio-económicos característicos de países tropicales en vía de desarrollo (Osorio y Segura, 2011).

Entre los principales problemas que presentan los animales de alto merito genético en condiciones de trópico, se encuentra el bajo consumo de materia seca, como respuesta al estrés calórico y la baja calidad de los forrajes. Los requerimientos nutricionales se determinan en base a la producción láctea, la composición química de la leche la fase de

gestación o el peso del animal, pero no se tienen en cuenta condiciones básicas de adaptación al medio ni pérdidas debidas a la entropía del sistema (Campos et al., 2007).

Las difíciles condiciones medio ambientales que deben enfrentar las vacas de producción de leche en el trópico, generan que se aumente la vulnerabilidad de estos animales a padecer trastornos metabólicos durante el periodo de transición; teniendo en cuenta que en ese momento tienen un importante desafío metabólico con altos requerimientos de energía y bajo consumo de alimento (Campos et al., 2007).





## 2. Metodología

La fase de campo del experimento se realizó entre el mes de agosto del año 2013 hasta el mes de mayo del año 2014, y contó con la licencia para experimentación animal otorgada por el comité de ética en investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

### Localización

La investigación se llevó a cabo en un sistema comercial semiintensivo de producción lechera, ubicado en el Valle del Cauca, 3º, 57 N, 76º, 15W; con altitud de 973 msnm, temperatura promedio de 25°C, y precipitación media anual de 1000 mm, encontrándose según la clasificación de Holdridge en una formación ecológica de Bosque Seco Tropical (BS-T), (Holdridge, 1987).

La explotación tiene una importante tradición ganadera en la región con más de cuarenta años dedicados a la producción y el procesamiento de leche, los animales cuentan con una composición genética basada en Holstein Colombiano, con un promedio de producción de leche individual por vaca de 20 L/día.

### Manejo nutricional de los animales

Los animales se encontraban bajo un sistema de pastoreo rotacional con pasto estrella *Cynodon plectostachyus*, suplementado con concentrado artesanal a voluntad durante los ordeños de la mañana y la tarde, (en la tabla 1 se presenta la composición nutricional de estos alimentos). La dieta fue balanceada por medio del software Spartan Dairy 3 (Michigan State University), versión 2010.

**Tabla 1. Análisis bromatológico del pasto estrella y el concentrado suministrado a los animales experimentales.**

<b>Nutriente (%)</b>	<b>Pasto estrella <i>Cynodon plectostachyus</i></b>	<b>Suplemento</b>
Materia seca	18,87	84,94
Cenizas	9,53	7,68
Proteína	18,06	27,56
Extracto etéreo	2,32	5,09
Carbohidratos	5,22	37,06
FDN*	64,87	22,61
FDA*	33,63	6,42
LDA*	4,18	1,18
Hemicelulosa	31,24	16,19
Celulosa	29,45	7,47
NDT *	55,6	71,9
Energía digestible (Mcal/Kg*MS)	2,6	2,8

\* FDN: Fibra detergente neutra, FDA: Fibra detergente Ácida, LDA: Lignina detergente ácida, NDT: Nutrientes digestibles totales.

### **Sujetos experimentales y tratamientos**

La selección de los animales se realizó teniendo en cuenta dos aspectos fundamentales: la producción de leche individual y los registros reproductivos eligiendo animales cuya

fecha esperada de parto se encontraba entre los 30 y 45 días antes de iniciarse el experimento.

Cumplidas las condiciones de selección, fueron elegidos aleatoriamente 21 animales, los cuales fueron distribuidos también en forma aleatoria en 3 grupos experimentales de 7 vacas cada uno. Donde los tratamientos fueron:

Un grupo control (T1), sin suplementación mineral y vitamínica.

Al siguiente grupo (T2) se le asignó el tratamiento 1 en el cual los animales recibieron un suplemento yodo estable suministrado por dosificación parenteral intramuscular en dosis de 3 ml/100Kg de peso vivo cada 15 días. La cantidad real disponibilizada de yodo para T2 fue de 620,4 mg/vaca en cada aplicación.

Al tercer grupo de animales (T3) se le asignó el tratamiento 2 y recibieron un suplemento remineralizante conformado por Calcio, fósforo, selenio, zinc y yodo, adicionalmente se les suministro un suplemento polivitamínico compuesto por vitaminas del complejo B: B1, B2, B3, B6, B12. Cada uno de los suplementos fueron aplicados por vía parenteral intramuscular en dosis de 1ml/20Kg de PV quincenalmente. La cantidad real de minerales y vitaminas disponibilizadas quincenalmente para cada vaca fue: Calcio 100 mg, Fósforo 2000 mg, cinc 400 mg, selenio 4,4 mg, yodo 400 mg, vitaminas B1 200 mg, B2 60 mg, B3 2000 mg, B6 100 mg, y B12 2000 mg.

El periodo experimental fue de 135 días con un intervalo entre colecta de muestras de 15 días. Los muestreos se distribuyeron de la siguiente forma: dos en el preparto (30 y 15 días antes del parto), un muestro al parto y 7 muestreos posteriores hasta llegar al día 105 posparto de las vacas, para un total de 10 muestras por animal y 210 para todo el experimento.

En cada muestreo se realizó evaluación de condición corporal, obtención de muestras de sangre por venipunción coccígea utilizando tubos al vacío con anticoagulante (EDTA) y sin anticoagulante, se realizó la aplicación de los productos designados a cada tratamiento y se obtuvieron muestras de orina. Las muestras de leche fueron tomadas del medidor de la maquina ordeñadora después del paso de cada animal.

### **Análisis de muestras**

Con las muestras de orina se realizó análisis químico macroscópico in situ usando tiras reactivas de orina (Multistix® 10SG, Siemens) con la finalidad de detectar la presencia de cetonas. Esta es una prueba semicuantitativa que permite detectar la concentración de Acetoacetato (AcAc) y clasificarla dentro de los siguientes umbrales: negativo, trazas (0,49 mmol/L), bajo (1,46 mmol/L), moderado (3,92 mmol/L), alto (7,84 mmol/L) y muy alto (15,68 mmol/L). La especificidad de la prueba es baja y la sensibilidad se encuentra entre 0,49 y 0,98 mmol/L.

Las muestras de sangre y leche fueron trasladadas en refrigeración al laboratorio de Reproducción y Bioquímica Animal de la Universidad Nacional de Colombia (Palmira).

Las muestras de sangre sin anticoagulante se centrifugaron a 2500 rpm por 25 minutos para la obtención de suero sanguíneo y fue almacenado en alícuotas a -20°C para la posterior determinación de metabolitos y hormonas.

Las muestras de sangre con anticoagulante fueron usadas para realizar cuadro hemático y medir hematocrito. Para el cuadro hemático se realizaron extendidos de sangre en porta objetos y tinción utilizando colorante de Wright y solución buffer, la lectura de las placas se realizó en microscopio óptico a objetivo de 100x, realizando conteo leucocitario (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos). Para el hematocrito se colocó sangre en los capilares, se sellaron con plastilina y se ubicaron en una microcentrifuga a 5000 rpm por 10 minutos y se leyeron utilizando una tabla estándar.

Con las muestras de leche se obtuvo información de densidad y composición química (grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos y minerales) utilizando equipo analizador ultrasónico de leche Boeco® modelo LAC-SA-90 (Hamburgo, Alemania). Los datos de producción de leche se obtuvieron de los registros de producción diaria que se llevan en la finca.

Las hormonas y metabolitos sanguíneos analizados se encuentran en la tabla 2. Los metabolitos fueron medidos por pruebas enzimáticas colorimétricas con reactivos comerciales utilizando el equipo Analizador de química semiautomático de lectura óptica RAYTO® (Shenzhen, China). Para el control de calidad intraensayo se utilizó una

muestra de control bovino nivel 2 (valores fisiológicos) cada 15 muestras en cada una de las pruebas.

**Tabla 2. Metabolitos y hormonas analizados**

<b>METABOLITO U HORMONA</b>	<b>TECNICA</b>	<b>REFERENCIA COMERCIAL</b>	<b>MARCA COMERCIAL</b>
Betahidroxibutirato (BHB)	NAD+/ 3-hidroxibutirato deshidrogenasa	Ranbut (RB1007)	Randox
Ácidos grasos no esterificados (NEFA)	Acil Coenzima A Sintetasa/Ascorbato Oxidasa	NEFA (FA115)	Randox
Glucosa	Glucosa Oxidasa / 4- Aminofenazona	GLUC-PAP (GL2623)	Randox
Albumina	Verde de Bromocresol	ALB (AB362)	Randox
Alaninoaminotrasferasa (ALT)	LD/α oxoglutarato	ALT (AL2360)	Randox
Aspartato aminotransferasa (AST)	MDH/LH/α oxoglutarato	AST (AS2359)	Randox
Calcio (Ca)	Arsenazo III	Ca (CA590)	Randox
Fósforo (P)	Molibdato	PHOS (PH1016)	Randox
Magnesio (Mg)	Azul de Xilidil	Mg (MG531)	Randox
Cortisol	ELISA	Cortisol (DNOV001)	NovaTec
T4	ELISA	T4 total (DNOV054)	NovaTec
T3	ELISA	T3 total (DNOV053)	NovaTec
Insulina	IRMA	Insulina (KIP1251)	DIA SOURCE

Las hormonas cortisol, Triyodotironina y Tiroxina fueron cuantificadas mediante la técnica de ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), en un equipo Lector de placas de ELISA marca Rayto® (Shenzhen, China). Insulina fue medida por análisis inmunoradiométrico (IRMA) de fase sólida y la lectura (desintegraciones por minuto) fue realizada en equipo monopocho Nucleonics (Berkeley, Estados Unidos).

### **Determinación de índices para estimar resistencia insulínica**

Para estimar la resistencia insulínica se utilizó el modelo matemático propuesto por Matthews et al. (1985), "Homeostasis model assessment (HOMA)", el cual permite realizar estimaciones de sensibilidad a la insulina y la función de las células beta en base a las concentraciones de glucosa (mmol/L) e insulina ( $\mu\text{U/ml}$ ) plasmáticas, por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{HOMA}_{\text{IR}} = (\text{insulina} \times \text{glucosa})$$

Paralelamente se aplicaron tres modelos estimativos: "Quantitative Insuline Sensitivity Check Index" (QUICKI) Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index" (RQUICKI) y Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index BHB" (RQUICKI<sub>BHB</sub>). Las ecuaciones se describen a seguir:

$$\text{QUICKI} = 1 / [\log (G) + \log (I)]$$

Dónde:

G = Glucosa (mg/dl)

I = Insulina ( $\mu\text{U/ml}$ )

El siguiente fue el modelo "Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index" (RQUICKI) fue implementado en vacas de producción de leche por Holtenius y Holtenius (2007). Se basa en las concentraciones de Glucosa, insulina y ácidos grasos libres.

$$\text{RQUICKI} = 1 / [\log (G) + \log (I) + \log (\text{NEFA})]$$

Dónde:

G = Glucosa (mg/dl)

I = Insulina ( $\mu$ U/ml)

NEFA = Ácidos grasos no esterificados (mmol/L)

El método “Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index BHB” ( $RQUICKI_{BHB}$ ) además de glucosa, insulina y ácidos grasos libres, se incluye la concentración de Betahidroxibutirato (BHB):

$$RQUICKI_{BHB} = 1 / [\log (G) + \log (I) + \log (NEFA) + \log (BHB)]$$

Dónde:

G = Glucosa (mg/dl)

I = Insulina ( $\mu$ U/ml)

NEFA = Ácidos grasos no esterificados (mmol/L)

BHB = Betahidroxibutirato (mmol/L)

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron almacenados en una base de datos de Excel para ser procesados en el paquete estadístico InfoStat, versión 2014 (Di Rienzo et al., 2014). Se empleó un diseño mixto de medidas repetidas en el tiempo (utilizando el procedimiento Modelos lineales generales y Mixtos). Los tratamientos, los periodos y la interacción entre estos constituyeron los efectos fijos, el animal representó el efecto aleatorio, y la covariable fue la producción de leche estimada para la lactancia. Las variables fueron evaluadas por normalidad y heterocedasticidad. Cuatro estructuras de covarianza se evaluaron en su capacidad de ajuste, errores independientes, simetría compuesta, no estructurada y autorregresiva de primer orden. El menor valor de criterio de información de Akaike (AIC) y el criterio de información bayesiano (BIC) fueron utilizados como métodos para determinar la mejor estructura de covarianza. Las comparaciones entre medias con diferencias estadísticas significativas se realizaron por medio de la prueba DGC (Di

Rienzo, Guzmán y Casanoves). Para las variables hemáticas, los índices de resistencia insulínica y la condición corporal se empleó un análisis de varianza y una prueba de Duncan para comparación de medias. El coeficiente de Pearson fue usado para determinar correlaciones entre variables. Además se realizó un análisis descriptivo exploratorio de tipo unidimensional, incluyendo medias y desviación estándar.



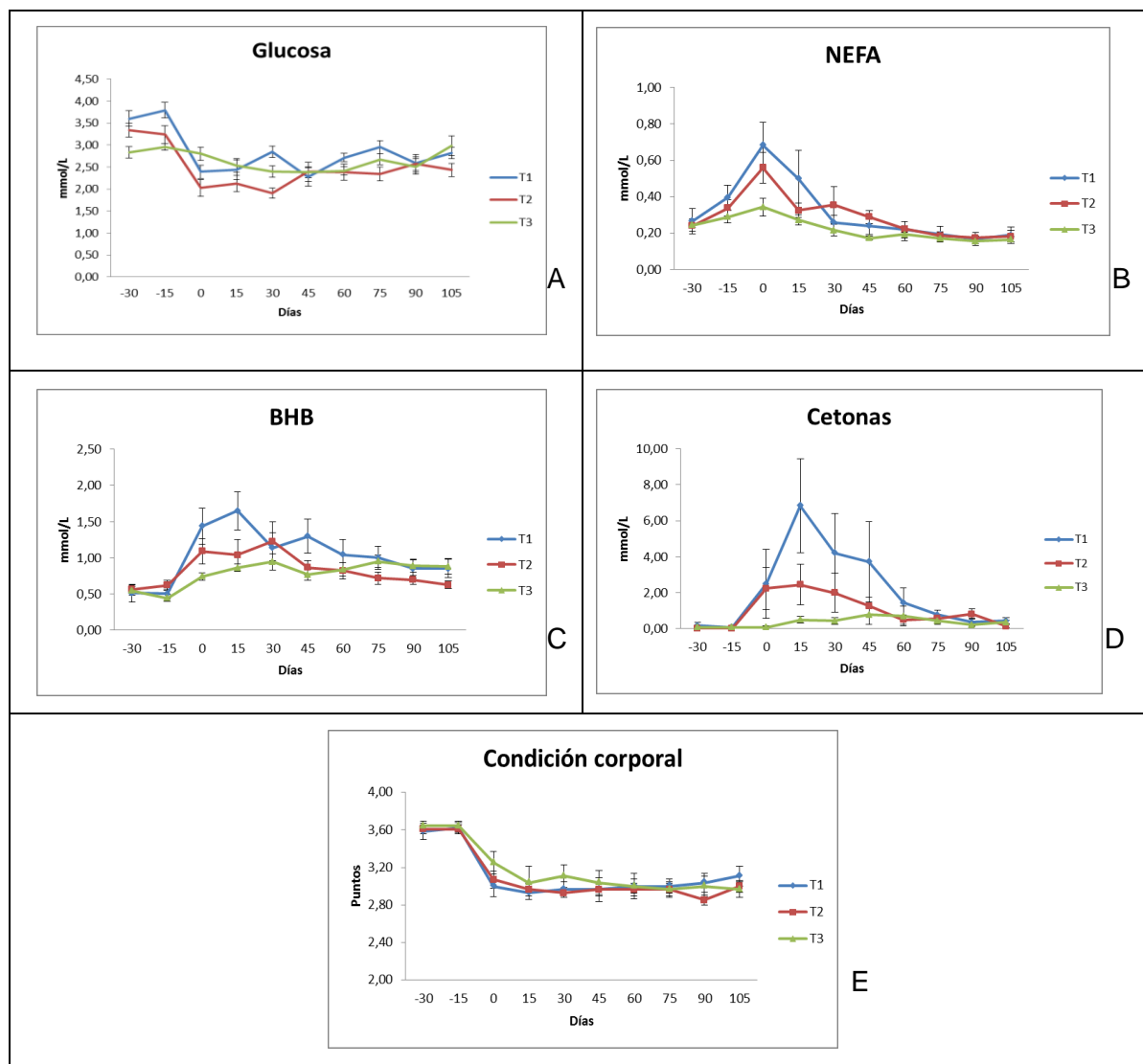
## **3.Resultados y Discusión**

### **3.1 Metabolismo Energético y Condición Corporal**

El valor medio de glucosa para T1 fue de  $2,92 \pm 0,50$  mmol/L, que difiere estadísticamente de T2,  $2,66 \pm 0,47$  mmol/L y T3 con  $2,52 \pm 0,23$  mmol/L. Los días -30 y -15 (preparto) presentaron los valores más altos de glucosa, que luego descienden y se mantienen constantes hasta el día 90 y, ascienden nuevamente en el día 105 una vez ha sido superada la alta demanda energética (Grafica 1-A). La interacción grupo-periodo presentó diferencias significativas (tabla 3) para el día -30 en T1 y T2 y el -15 en T1 con los valores más altos en relación a los demás periodos y grupos experimentales.

Los valores de referencia para glucosa en vacas de producción de leche se encuentran entre 2,50 y 4,16 mmol/L (Kaneko et al., 2008). Sin embargo, durante el periparto estos animales presentan una disminución en la concentración sérica de este metabolito, con valores característicos entre 1,99 y 2,88 mmol/L (Pal y Battha, 2013). En el presente estudio se encontró un comportamiento con valores altos en el periodo preparto, una marcada disminución al parto para los tres grupos experimentales la cual coincide con los valores determinados por Pal y Battha (2013) y un aumento gradual en la concentración sérica a partir del día 45 posparto, coincidente con lo informado por Kaneko, et al (2008) (Gráfica 1-A).

42 Suplementación mineral y vitamínica de vacas lecheras en trópico durante el periodo de transición: efecto sobre perfil metabólico, lácteo, hormonal y resistencia insulínica



**Gráfica 1.** Comportamiento de los metabolitos energéticos para los tres grupos experimentales desde el día 30 antes del parto hasta el día 105 posparto, el día 0 corresponde al parto. Concentración sanguínea de A. Glucosa (mmol/L), B. NEFA (mmol/L), C. BHB (mmol/L), D. Concentración de cetonas en orina (mmol/L), E. Condición corporal (puntos)

Entre los grupos se encontraron diferencias significativas para T1 en comparación con T2 y T3, en la gráfica 1-A, se puede observar que en T1 se presentaron los valores más altos de glucosa en el periodo preparto y descenso el día del parto, tal vez como respuesta comportamental al manejo en la colecta de muestras, ya que la mayoría de estos animales exhibían una conducta más nerviosa. Un comportamiento similar se halló para T2 y T3, siendo que este último evidenció menores oscilaciones para este metabolito, esto puede deberse a que este grupo fue suplementado con una mezcla de minerales y vitaminas entre los que se encontraban el fósforo y la vitamina B12, los cuales participan en la regulación de los procesos gluconeogénicos a nivel de ciclo de krebs (Rollin et al., 2010).

La glucosa es el combustible universal en los mamíferos, siendo utilizada como fuente de energía en el cerebro, los eritrocitos, la medula renal y el tejido mamario. La mayoría de mamíferos no rumiantes obtienen una cantidad significativa de glucosa a partir de la absorción intestinal, sin embargo, en los rumiantes la cantidad de glucosa absorbida desde la digestión intestinal de almidón es limitada (Aschenbach et al., 2010). Los rumiantes dependen mayormente del proceso de absorción de ácido propionico desde el rumen y de la gluconeogénesis para el suministro de glucosa. Los principales precursores de glucosa en vacas lecheras son el propionato, el glicerol, el lactato y los aminoácidos glucogénicos. En vacas lecheras, los requerimientos de glucosa no solo son la fuente de energía sino también deben garantizar la síntesis de lactosa para la alta producción de leche (Preynat et al., 2009).

Los NEFA presentaron su mayor concentración el día del parto, seguido de los días -15 preparto y 15 posparto; los periodos restantes presentaron menores concentraciones de NEFA. En la interacción grupo – periodo se encontró el valor más alto en el día del parto para T1 presentando diferencias con los demás grupos y periodos (tabla 3), T2 en el del parto y T1 en el día 15 evidenciaron menores concentraciones. Los valores medios para grupos fueron de  $0,31 \pm 0,16$  mmol/L para T1,  $0,28 \pm 0,11$  mmol/L para T2 y  $0,24 \pm 0,16$  mmol/L para T3 sin diferencias significativas.

La concentración sanguínea de NEFA es utilizada como un indicador de movilización de lípidos en el organismo, y por tanto, la cuantificación de las concentraciones de este metabolito en plasma es usada como herramienta de diagnóstico para evaluar el grado de BEN en las vacas en periodo de transición (Contreras y Sordillo, 2011; Quiroz et al.,

2009). Contreras y Sordillo (2011) afirman que al final de la lactancia y en el inicio del periodo seco se encuentran valores menores a 0,2 mmol/L, mientras en las dos semanas anteriores al parto los niveles de NEFA en sangre comienzan a aumentar hasta llegar a su punto máximo entre los días 0 y 10 posparto con concentraciones cercanas a 0,75 mmol/L dependiendo del grado de movilización de lípidos. Cuando los valores sobrepasan una concentración de 1,0 mmol/L se asocia a lipomovilización que puede incidir en la presentación de cetosis, además, es común encontrar las concentraciones altas de este metabolito en animales obesos o con condición corporal mayor o igual a 4 puntos en la escala de ganado lechero (Contreras y Sordillo, 2011). Por su parte, Quiroz et al. (2009), plantean que el rango en concentración de NEFA para vacas de alta producción de leche se encuentra entre 0,1 y 0,4 mmol/L en periodo de transición, y que animales que alcancen valores cercanos a 0,5 mmol/L se encuentran en alto riesgo de presentar disfunciones metabólicas asociadas a la alta movilización de lípidos. Díaz et al. (2011) plantean que valores de NEFA hasta 0,25 mmol/L indican una estabilización en el balance energético, mientras concentraciones superiores a 0,4 mmol/L exhiben una intensa lipomovilización, y mayores a 0,7 mmol/L aumentan el riesgo de cetosis. En la presente investigación se encontraron concentraciones superiores a 0,4 mmol/L para el día del parto en T1 y T2, y para el día 15 posparto para T1 (Gráfica 1-B), lo que puede haber incidido en la presentación de cetosis subclínica

Los NEFA pueden ser oxidados en los hepatocitos para producción de energía, o pueden ser exportados como constituyentes de las lipoproteínas de muy baja densidad. La liberación de NEFA desde el tejido adiposo en el posparto como respuesta a las demandas de energía supera la capacidad de oxidación de estos compuestos en el hígado, provocando la formación de cuerpos cetónicos; los cuales se liberan al torrente sanguíneo o pueden también ser reesterificados a triglicéridos que se almacenan en los hepatocitos (Gross et al., 2013).

Beta-hidroxibutirato (BHB) presentó la menor concentración en los días 30 y 15 antes del parto, mientras el valor más alto se encontró en el día 15 posparto (Figura 1-C). En la interacción grupo – periodo se encontraron los valores más altos del experimento para T1 en los días 0, 15 y 45 y para T2 en el día 30. Los demás periodos para los tres grupos evidenciaron concentraciones menores. Los valores medios para los grupos fueron de

1,03  $\pm$  0,37 mmol/L para T1, 0,82  $\pm$  0,22 mmol/L para T2, y 0,78  $\pm$  0,17 mmol/L para T3 sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas (tabla 3).

BHB se considera un indicador clave de la cetogénesis hepática. En vacas sanas la concentración de BHB debe estar por debajo de 1,00 mmol/L en la lactancia temprana y por debajo de 0,60 mmol/L en la gestación tardía, indicando que valores por debajo de 0,85 mmol/L en la lactancia y 0,60 mmol/L hasta una semana antes del parto podrían ser asociados a bajo riesgo de cetosis (Remppis et al., 2011). Los valores encontrados en el presente trabajo, fueron superiores a los anteriormente citados y estos son coincidentes con la presentación de cetosis en los animales experimentales.

Concentraciones de BHB mayores a 1,00 mmol/L y hasta 1,40 mmol/L indican que los animales presentan una cetosis subclínica; es común encontrar estos valores entre la primera y la tercera semana posparto. Concentraciones mayores a 1,40 mmol/L en la mayoría de casos están acompañadas de síntomas clínicos de cetosis (Suthar et al., 2013). En el presente trabajo se encontraron valores superiores a 1,40 mmol/L en T1 para el día 0 y para el día 15, valores entre 1,00 y 1,40 mmol/L se encontraron en T1 para los días 30, 45, 60 y 75 posparto y para T2 en los días 0, 30 y 45, para T3 todos los valores fueron menores a 1,00 mmol/L. T1 (sin suplementación) mostró mayor tendencia a valores altos asociados con mayor riesgo de cetosis. Se ha encontrado que concentraciones de BHB mayores a 1,00 mmol/L están asociadas con una menor tasa de preñez, y que la probabilidad de desarrollar desplazamiento de abomaso, cetosis clínica y metritis aumentan de 2,6 a 8, de 3 a 6 y de 1 a 5,8 veces, respectivamente, cuando los valores de BHB superan 1,20 mmol/L en las primeras 2 semanas posparto (Suthar et al., 2013).

La incidencia de cetosis subclínica que se encontró en el presente trabajo fue de 71,4% en T1, 57,1% en T2 y 71,4% en T3, teniendo en cuenta el porcentaje de animales que por lo menos en uno de los periodos analizados exhibió valores de BHB superiores a 1,00 mmol/L. Sin embargo, el porcentaje de animales que presentó valores superiores a 1,4 mmol/L fue 42,9% en T1, 28,6% en T2 y 0% en T3.

La concentración media de cetonas en orina determinada mediante los promedios asignados a la calificación cualitativa traza, baja, media, alta y muy alta, correspondieron en el experimento a: 2,05  $\pm$  2,25 mmol/L para T1; 1,00  $\pm$  0,94 mmol/L para T2 y 0,36  $\pm$

0,25 mmol/L para T3. El valor más alto de cetonas se encontró en el día 15 posparto para T1 con 6,85 mmol/L.

Tanto BHB, como acetona y acetoacetato se pueden encontrar no solo en sangre sino también en otros fluidos como orina y leche (Krogh et al., 2011). Una de las principales pruebas que ha permitido realizar la evaluación y determinación de cetonas en campo es la realizada con tiras reactivas de orina, la cual es semicuantitativa y mide la concentración de acetoacetato (AcAc), siendo una prueba con aceptable especificidad (proporción de animales no enfermos que aparecen negativos en la prueba) y sensibilidad (proporción de animales enfermos que aparecen positivos en la prueba) en comparación con la medición de BHB en sangre, considerada la prueba diagnóstica de mayor precisión (Carrier et al., 2004; LeBlanc, 2010).

Se considera que la prueba es positiva a cetosis cuando el valor de AcAc obtenido es igual o superior al nivel Moderado (Krogh et al., 2011). Otros autores establecen que animales con valores por encima del umbral bajo deben ser considerados en riesgo de desarrollar esta patología y deberían recibir tratamiento preventivo (Carrier et al., 2004, LeBlanc, 2010). Para este experimento, se encontró una concentración superior al umbral moderado para el día 15 posparto en T1, y superior al nivel bajo en los días 0, 15 y 30 posparto para los tres grupos experimentales (Gráfica 1-D), lo que indica que todos los animales presentaron algún grado de excreción de cuerpos cetónicos en orina, ya fuera por movilización lipídica o proveniente del sistema digestivo.

La condición corporal (CC) presentó diferencias significativas entre periodos (tabla 3), evidenciando una marcada disminución al momento del parto (Gráfica 1-E). Los valores medios obtenidos en los grupos fueron  $3,12 \pm 0,26$ ;  $3,09 \pm 0,28$  y  $3,16 \pm 0,27$  puntos, para T1, T2 y T3, respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por Adrien et al. (2012) bajo condiciones de pastoreo en vacas de alta producción y Zachut et al. (2013) en vacas Holstein en confinamiento.

La evaluación de condición corporal es considerada como un buen indicador de la cantidad de reservas corporales en las vacas lecheras; y sus cambios pueden ser asociados con la movilización o depósito de tejido adiposo (Zachut et al., 2013). Inmediatamente después del parto la CC disminuye notablemente, asociándose a balance energético negativo, e indicando cambios en los perfiles metabólico y hormonal

de los animales (Wathes et al., 2009). Para vacas Holstein, se ha establecido que la puntuación de CC antes del parto debe encontrarse entre 3,0 y 3,5 y no se debe perder más de un punto después del parto hasta el pico de producción, teniendo en cuenta que para ganado lechero la escala va de 1 a 5 puntos (Adrien et al., 2012).

La reducción en la condición corporal al parto ( $> 1$  punto) va a repercutir negativamente en el desempeño productivo y reproductivo de las vacas en el posparto (Wathes et al., 2009). Se ha encontrado que una alta pérdida de CC conlleva a mayor tiempo en la reactivación ovárica, con mayores intervalos entre el parto y la primera ovulación, además de que afecta el consumo de alimento y puede tener efectos negativos sobre la producción de leche (Jouany, 2006). Animales con CC superior a 3,5 en el preparto son altamente susceptibles a padecer cetosis en el posparto temprano, debido a que pueden tener un mayor grado de movilización de reservas grasas que animales con una CC inferior (Contreras y Sordillo, 2011).

La evaluación de condición corporal permite determinar el grado de reservas corporales de los animales por medio de evaluación visual, y así generar programas de manejo donde se evite el sobre acondicionamiento de las vacas antes del parto y se esté eliminando uno de los principales factores predisponentes para la presentación de cetosis subclínica y consecuentemente de hígado graso (Nowroozi et al., 2011).

**Tabla 3. Significancia estadística asociada a los metabolitos energéticos**

Variable	Modelo	Grupo	Periodo	Grupo*Periodo	Covarianza
Glucosa	<0,0001	0,0206	<0,0001	<0,0001	NS*
NEFA	0,0009	0,7788	<0,0001	0,6144	0,0035
BHB	<0,0001	0,9725	<0,0001	<0,0001	NS
CC	<0,0001	0,7199	<0,0001	0,9693	-

Cuando  $p < 0,05$  se considera que existen diferencias estadísticas, \* NS indica que en el primer ensayo estadístico realizado la covarianza no fue significativa y por tanto fue retirada del modelo para ese metabolito.

Las relaciones estadísticas entre los metabolitos energéticos y condición corporal determinaron que la glucosa se correlacionó negativamente con NEFA (-0,15;  $p < 0,0274$ ), BHB (-0,39;  $p < 0,0001$ ) y cetonas (-0,30;  $p < 0,0001$ ), mientras evidenció una correlación positiva con CC (0,47;  $p < 0,0001$ ). BHB presentó correlación positiva con NEFA (0,51;  $p < 0,0001$ ) y cetonas (0,72;  $p < 0,0001$ ), mientras su relación con CC fue negativa (-0,15;  $p < 0,0373$ ). NEFA y cetonas se correlacionaron positivamente (0,51;  $p < 0,0001$ ).

Estos resultados coinciden con los hallados por Krogh et al. (2011), que plantean una alta asociación de la prueba con tiras reactivas para orina en comparación con diferentes análisis realizados en leche; lo cual permite considerar diferentes fluidos para la prueba. Las correlaciones entre la concentración de metabolitos sanguíneos (glucosa, NEFA, BHB) y de cetonas en orina evidencian una importante asociación, indicando que el uso de tiras reactivas para orina podría ser aplicado como un método de detección rápida de cetosis subclínica. La relación entre mayor concentración de BHB, NEFA y cetonas con menores valores de glucosa y menor condición corporal, son importantes indicadores de BEN en los animales, evidenciando un déficit energético en el organismo que conlleva a una alta movilización de reservas grasas que a su vez ocasiona una mayor pérdida de condición corporal (Wathes et al., 2009).

Los metabolitos analizados (glucosa, NEFA, BHB y cetonas) permiten evaluar la lipomovilización y el estado energético de los animales; los resultados encontrados son similares a otros trabajos realizados (Campos et al., 2007), donde se evidencia un comportamiento característico para cada metabolito en el periodo de transición. Normalmente se presenta disminución en glucosa y aumento de NEFA, BHB y cetonas al momento del parto, lo cual es atribuido principalmente a la disminución en el consumo de materia seca (CMS) que se inicia dos semanas antes del parto (Fenwick et al., 2008). En condiciones fisiológicas, el consumo de alimento debe recuperarse entre las semanas 2 a 4 posparto con lo cual los metabolitos sanguíneos logran estabilizarse gradualmente (Esposito et al., 2014).

Con la reducción en CMS y la consecuente movilización de grasa corporal, se presenta un desequilibrio entre la disponibilidad de nutrientes lipogénicos y glucogénicos, dada por el exceso de nutrientes C2 (producto de la lipomovilización) que no se pueden oxidar completamente por la deficiencia de nutrientes C3 (consecuencia del menor CMS y del



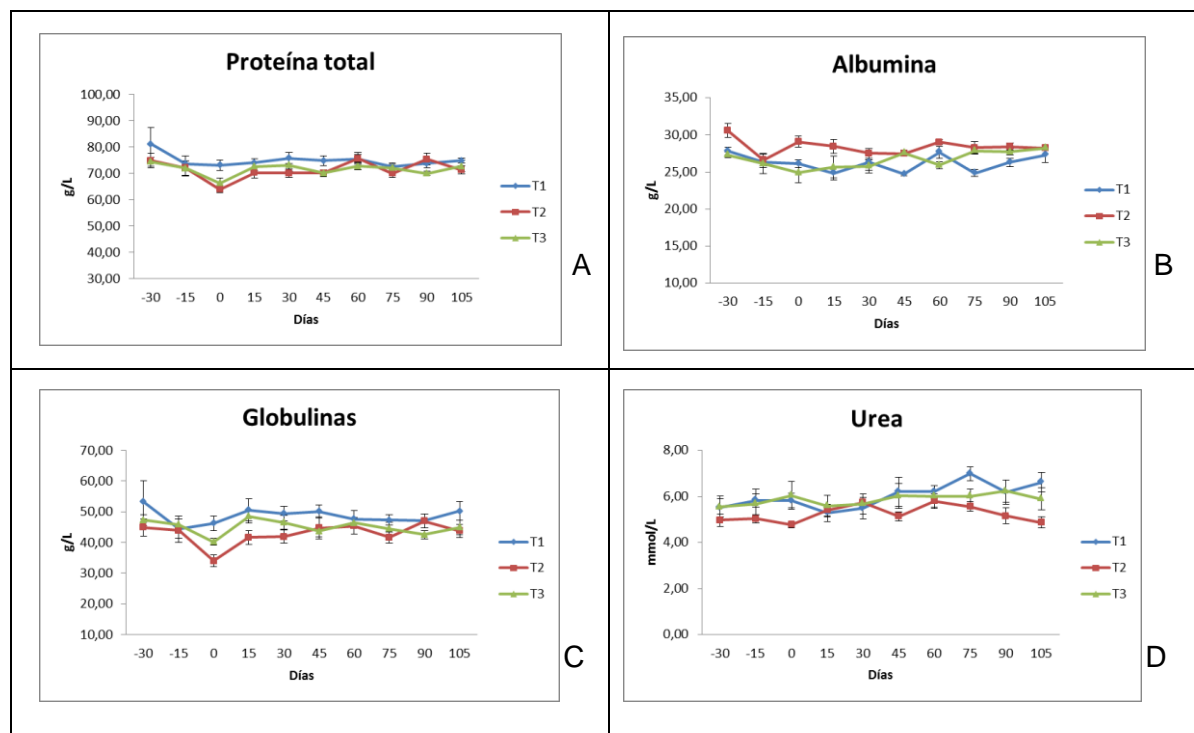
transporte de estos sustratos a la glándula mamaria para la formación de lactosa) (Van Knegsel et al., 2007), y por tanto se da la oxidación incompleta a cuerpos cetónicos o reesterificación de ácidos grasos a triglicéridos que son almacenados en el hígado (Esposito et al., 2014).

La reducción en el consumo de alimento, sumado al aumento en los requerimientos nutricionales de las vacas al inicio de la lactancia, generan un desbalance entre los nutrientes requeridos y los consumidos, ocasionando que las vacas entren en balance energético negativo y se vean obligadas a movilizar sus reservas corporales, lo cual se refleja en altas concentraciones de NEFA y BHB durante el inicio de la lactancia (Ospina et al., 2010). Cuando el desbalance energético es excesivo las vacas pueden presentar diferentes desordenes metabólicos o problemas infecciosos agravados por la inmunosupresión característica de este periodo, además de que se va a disminuir la producción de leche y se va a afectar el retorno a la actividad reproductiva (Ospina et al., 2010).

Los indicadores metabólicos en los grupos experimentales que no se encontraron diferencias estadísticas significativas no se discutieron ya que el experimento se enfocó en la búsqueda de indicadores que permitieran determinar con mayor precisión situaciones asociadas a cetosis y resistencia insulínica.

## 3.2 Metabolitos Proteicos

Los valores medios y la desviación estándar para cada uno de los metabolitos en los grupos experimentales y periodos evaluados se encuentran en el Anexo B. Para proteína total se encontró el menor valor en el día 0, mientras los valores más altos se hallaron en el periodo preparto (días -30 y -15), seguidos del día 105 posparto. En la interacción grupo – periodo se evidenciaron los menores valores en T2 y T3 para el periodo 3 (día 0) difiriendo de los demás grupos y periodos (tabla 4), mientras que en los días -30 y -15 T1 exhibió los mayores valores (Gráfica 2-A). Los valores medios de T1, T2 y T3 fueron  $74,61 \pm 2,42$ ;  $71,61 \pm 3,50$  y  $71,39 \pm 2,31$  g/L, respectivamente.



**Gráfica 2. Comportamiento de los metabolitos proteicos para los tres grupos experimentales desde el día 30 antes del parto hasta el día 105 posparto, el día cero corresponde al parto. Concentración sanguínea de A. Proteína total (g/L), B. Albumina (g/L), C. Globulinas (g/L - Diferencia entre proteína total y albumina), D. Urea (mmol/L).**

Los valores de referencia para proteína total en vacas sanas se encuentran entre 67,4 y 74,6 g/L (Kaneko et al., 2008). En el presente trabajo se encontraron valores superiores a este rango en los días -30, 30, 45, 60 y 105 en T1, y en los días -30, 60 y 90 en T2, tan solo en el día 0 de T2 se encontró una concentración inferior a 67,4 g/L, mientras que para T3 todos los valores estuvieron dentro del rango informado. Sin embargo otros trabajos indican valores superiores al límite máximo dado por Kaneko et al. (2008). Yokus y Dilek (2006) informan valores entre 75,4 y 77,0 g/L, Tóthová et al (2008) obtienen valores entre 66,88 y 84,27 g/L durante el periodo de transición con un comportamiento similar al observado en el presente estudio, con valores altos en el periodo preparto que disminuyen una semana antes del parto y se incrementan una semana después del parto.

Las proteínas totales representan la cantidad total de proteínas que se encuentran en el suero sanguíneo, y su concentración puede reflejar el estado nutricional de los animales, además de apoyar el diagnóstico de enfermedades renales o hepáticas (Tóthová et al., 2008). Una baja concentración de proteínas totales puede indicar problemas de subnutrición, malabsorción, agammaglobulinemia, glomerulonefritis u otras patologías. Sin embargo, es común que en el inicio de la lactancia la concentración de proteínas totales se disminuya por la transferencia de albumina y gamma-globulinas a la glándula mamaria, y por el menor consumo de alimento que se presenta en ese periodo (Tóthová et al., 2008).

Para albumina, la concentración más alta se encontró en los días -15, 60, 90 y 105 difiriendo estadísticamente de los periodos restantes (tabla 4), el menor valor se encontró en el periodo 4 (día 15). El valor medio de T2 fue de  $28,38 \pm 1,08$  g/L mostrando diferencias significativas en comparación con T1 que evidenció una concentración de  $26,19 \pm 1,15$  g/L y T3 con  $26,69 \pm 1,16$  g/L. En la interacción grupo – periodo se encontró el valor más alto del experimento para T2 en el periodo 1 (día -30) mostrando diferencias significativas con los demás grupos y periodos (Gráfica 2-B).

Kaneko et al. (2008) presentan valores de referencia entre 30,3 y 35,5 g/L para la concentración sérica de albumina. Los valores encontrados en el presente estudio se encuentran por debajo de este rango, en todos los periodos y grupos a excepción de T2 en el periodo 1 (día -30). Otros trabajos realizados durante el periodo de transición y lactancia evidencian valores superiores a los hallados en el presente trabajo (Tóthová et al., 2008, Yokus y Dilek, 2006). Sin embargo, Campos et al. (2007) presentan valores medios de  $25,8 \pm 4,4$  g/L para vacas Holstein en condiciones de trópico colombiano. La mayor concentración de albumina que se presentó en T2 respecto a T1 y T3 puede deberse a que en este grupo se realizó suplementación con yodo, el cual podría haber estimulado la producción de hormonas tiroideas que participan en el metabolismo proteico (Huszenicza et al., 2002), y así, favorecer una mayor producción de albumina en los animales de este grupo.

La albumina es importante en la regulación del volumen sanguíneo ya que participa en el mantenimiento de la presión osmótica y en el transporte de ácidos grasos, bilirrubina no conjugada y algunas hormonas esteroideas (Tóthová et al., 2008). Una baja concentración sanguínea de albumina se puede presentar por pérdida excesiva de este metabolito o por

su producción insuficiente en el hígado (Russell y Roussel, 2007). La producción insuficiente de albumina puede ocurrir en animales con enfermedad hepática grave o crónica, y puede darse como resultado de ingesta, digestión o absorción inadecuada de proteína, mientras que en casos de enfermedad aguda o subaguda, la hipoalbuminemia se atribuye a la pérdida de albumina a través del riñón, del tracto gastrointestinal o en casos de hemorragia y exudación (Russell y Roussel, 2007). La hipoalbuminemia se puede presentar aun evidenciando concentraciones normales de proteínas totales (Russell y Roussel, 2007). La menor concentración de albumina puede atribuirse a las diferencias o a la menor habilidad hepática en algunos animales para la captación de aminoácidos (Campos et al., 2007)

Las globulinas exhibieron la menor concentración en el día 0 difiriendo estadísticamente de los demás periodos (tabla 4). El valor medio de T1 fue de  $48,78 \pm 2,56$  g/L mostrando diferencias significativas con T2 y T3 los cuales presentaron concentraciones de  $42,86 \pm 3,47$  y  $45,05 \pm 2,44$  g/L respectivamente. En la interacción grupo – periodo se encontraron diferencias estadísticas para T2 en el día 0 con el menor valor del experimento (Gráfica 2-C).

Kaneko et al. (2008) informan valores de referencia entre 30,0 y 34,8 g/L, encontrándose por debajo de los valores hallados en la presente investigación. Sin embargo, otros trabajos presentan mayores concentraciones de este metabolito, como es el caso de Law et al. (2009) que encontró valores entre 43,7 y 46,5 g/L al inicio de la lactancia, y Juniper, et al. (2006) con valores entre 48,6 y 50,6 g/L para vacas de alta producción después del día 54 posparto. Además de Campos et al. (2007) que informan valores de  $40,37 \pm 4,1$  g/L para vacas Holstein en condiciones de trópico colombiano.

Diferentes proteínas hacen parte de las globulinas, una gran fracción corresponde a inmunoglobulinas que son sintetizadas por las células linfoides, otra importante fracción es sintetizada en el hígado y una pequeña cantidad es sintetizada por otros tejidos. La alta concentración de globulinas se relaciona con estimulación antigénica crónica generalmente provocada por reticuloperitonitis traumática, neumonía, abscesos hepáticos o problemas relacionados con la función hepática (Russell y Roussel, 2007). Campos et al. (2007) relacionan la alta concentración de globulinas con la presencia de ecto y endoparásitos típicos del trópico, ya que estos son factores que van a generar una

reacción de respuesta inmune en el organismo y por lo tanto se induce una mayor síntesis de globulinas, lo cual podría explicar los valores altos encontrados en el presente trabajo. Según lo planteado anteriormente, la diferencia significativa encontrada entre los grupos, con mayor concentración de globulinas para T1 podría indicar una mayor susceptibilidad de los animales de este grupo a factores que inducen una respuesta inmune, en comparación con los animales de T2 y T3. La menor concentración de globulinas en el periodo del parto está directamente relacionada con la menor concentración de proteínas totales hallada en el mismo periodo, este por que el valor de globulina se obtiene por diferencia directa entre proteína y albumina.

Urea presentó diferencias significativas con los demás periodos en el día 75 posparto evidenciando el valor más alto (Gráfica 2-D). En la interacción grupo – periodo se encontraron diferencias significativas en los días 75 y 105 posparto con valores superiores a los hallados en los demás periodos y grupos (tabla 4). Los valores medios de concentración de urea en el presente estudio fueron de  $6,06 \pm 0,53$  mmol/L para T1,  $5,25 \pm 0,36$  mmol/L para T2 y  $5,87 \pm 0,23$  mmol/L para T3.

Kaneko et al. (2008) determina que valores normales de urea se encuentran entre 7,14 y 10,7 mmol/L, mientras que en un estudio realizado por Cozzi et al. (2011) en el cual buscaban definir valores de referencia de diferentes metabolitos para vacas lecheras de raza Holstein se plantea que vacas sanas pueden presentar concentraciones de urea entre 2,5 y 6,7 mmol/L. Tóthová et al. (2008) encontró valores entre 3,77 y 5,47 mmol/L para vacas de en periodo de transición, y Campos et al. (2007) presentan valores de  $3,7 \pm 1,1$  mmol/L para vacas Holstein en condiciones de trópico.

La urea es producida en el hígado como una forma de desintoxicación del amoníaco presente en la circulación sistémica (Burgos et al., 2010). El amoníaco es producido en el rumen a partir del catabolismo de los aminoácidos o a partir de la hidrólisis de fuentes de nitrógeno no proteicas. Cuando este no logra ser incorporado en el proceso de síntesis de proteína microbiana por deficiencia de energía, es absorbido en el torrente sanguíneo hasta llegar al hígado donde es convertido en urea (Moharrery, 2004). La urea va a la sangre y puede volver al rumen a través de la saliva para ser utilizada como fuente de nitrógeno no proteico, o difundirse en otros fluidos corporales como la leche, o se filtra en los riñones para su excreción en orina (Burgos et al., 2010). La concentración de urea en sangre es normalmente variable y se ve afectada por diferentes factores, como la ingesta

de proteína degradable o proteína no degradable en el rumen, el consumo de energía, la función hepática y la excreción en orina, por tanto, este es un metabolito usado como indicador de eficiencia del metabolismo proteico en el rumen (Moharrery, 2004).

Los valores hallados en el presente trabajo se encuentran dentro del rango de referencia informado por Cozzi et al. (2011), y por debajo del rango planteado por Kaneko et al. (2008), por tanto no indican un elevado consumo de proteína en la dieta, ni un marcado desbalance en el consumo de proteína y de energía a partir de la dieta.

**Tabla 4. Significancia estadística asociada a los metabolitos proteicos.**

Variable	Modelo	Grupo	Periodo	Grupo*Periodo	Covarianza
Proteína	<0,0001	0,0634	<0,0001	0,0019	NS*
Albumina	<0,0001	0,0018	0,0033	0,0066	NS
Globulinas	<0,0001	0,0279	0,0008	0,2389	NS
Urea	<0,0001	0,1862	0,0500	0,0136	NS

Quando  $p < 0,05$  se considera que existen diferencias estadísticas, \* NS indica que en el primer ensayo estadístico realizado la covarianza no fue significativa y por tanto fue retirada del modelo para ese metabolito.

En general, en el suero sanguíneo se encuentra gran variedad de proteínas, sin embargo, los dos principales componentes de las proteínas totales son la albumina y las globulinas, las cuales se encuentran incluidas en los estudios de perfil bioquímico por tener gran relevancia en la evaluación del estado metabólico de los animales (Russell y Roussel, 2007). Por una parte la albumina sintetizada en el hígado es la principal proteína responsable de la presión oncótica de la sangre, mientras que entre la familia de globulinas gran parte corresponden a inmunoglobulinas las cuales hacen parte del sistema inmune como mecanismos de defensa del organismo (Tóthová et al., 2008). Usualmente, se realiza la medición sanguínea de proteínas totales y de albumina, mientras que la fracción de globulinas es obtenida mediante la resta de la concentración de albumina de la concentración de proteínas totales, la diferencia de estas dos variables determina el valor de globulinas (Russell y Roussel, 2007).

Las proteínas séricas totales representan un indicador de metabolismo de nitrógeno, y su concentración depende en gran medida del contenido de proteína de la dieta, la fase de lactancia, la edad de la vaca y las condiciones climáticas dependiendo de la época del año (Onita y Colibar, 2009). Concentraciones altas de proteínas en suero sanguíneo de animales sanos pueden ser el resultado de una mejor síntesis de proteína o de una dieta con alto contenido en proteínas (Tóthová et al., 2008). El efecto de la proteína en la dieta de vacas lecheras ha sido ampliamente estudiado debido a que puede afectar la eficiencia productiva y reproductiva de los animales, por una parte un bajo aporte de proteína genera una disminución en la producción de leche, pero el exceso de proteína puede agravar el balance energético negativo en el inicio de la lactancia, con lo cual se retrasa el retorno a la actividad reproductiva (Onita y Colibar, 2009).

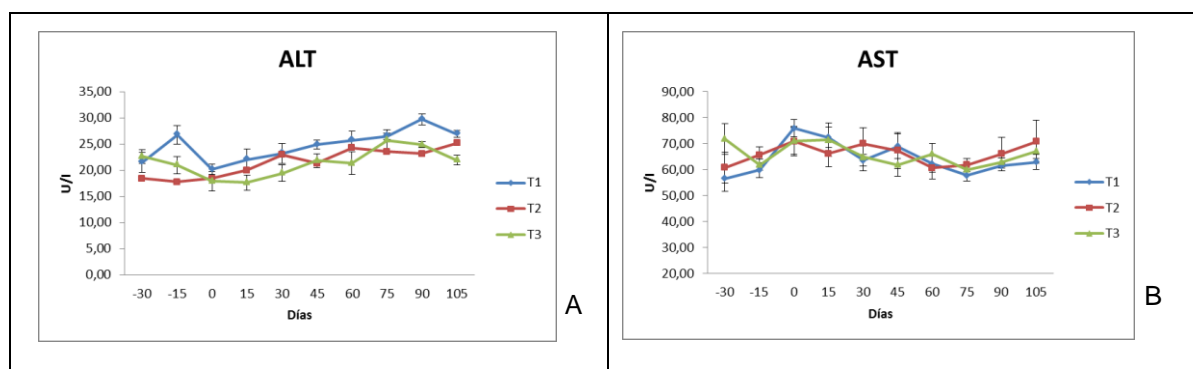
La urea es considerada otro indicador de metabolismo de nitrógeno, y la concentración de este metabolito se encuentra asociada a la relación energía:proteína en la dieta y a la capacidad del hígado de convertir el amoníaco en urea (Burgos et al., 2010). Niveles altos de urea en sangre pueden tener efectos tóxicos en el óvulo o el embrión después de la fecundación. Sin embargo, mientras los niveles de urea estén equilibrados con la oferta energética, este compuesto puede ser reutilizado por el rumen para la producción de proteína microbiana o en otros casos ser excretada en la orina (Onita y Colibar, 2009).

### 3.3 Enzimas Hepáticas

Los valores medios y la desviación estándar para cada una de las enzimas en los grupos experimentales y periodos evaluados se encuentran en el Anexo C. Las enzimas aminotransferasas son responsables de la transferencia de grupos amino y su acción es inducible por hormonas como tiroxina o glucocorticoides; su actividad es importante en el periodo de lactancia, donde se presenta una alta tasa metabólica y su valoración resulta útil en la determinación de la función hepática (Józwik et al., 2012, Liu et al., 2012). La AST es más específica de daño hepático en bovinos en comparación con otras especies. La ALT se encuentra casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que AST, se encuentra en el citosol y la mitocondria; en otros tejidos como el corazón, los

pulmones, el músculo esquelético, los riñones, el cerebro, el páncreas, los eritrocitos y leucocitos (Liu et al., 2012).

Para alanina aminotransferasa (ALT), T1 mostró mayor valor que los otros dos grupos con un valor medio de  $24,93 \pm 2,96$  U/L, frente a  $21,60 \pm 2,69$  U/L para T2 y  $21,47 \pm 2,66$  U/L para T3. En los días 60, 75, 90 y 105 se encontraron los valores más altos, difiriendo estadísticamente de los demás periodos (tabla 5), mientras los menores valores se presentaron en los días 0 (parto) y 15 posparto (Gráfica 3-A). En la interacción grupo – periodo se encontró que en el periodo 9 (día 90) de T1 se presentó el valor más alto del experimento mostrando diferencias estadísticamente significativas con los otros grupos y periodos.



**Gráfica 3. Comportamiento de las enzimas hepáticas para los tres grupos experimentales desde el día 30 antes del parto hasta el día 105 posparto. Concentración sanguínea de A. ALT (U/L), B. AST (U/L).**

Kaneko et al. (2008) presentan valores de referencia para ALT entre 11 y 40 U/L. Józwik et al. (2012) halló valores de  $39,54 \pm 0,06$  U/L para vacas Holstein en los primeros 60 días de lactancia, mientras Sahinduran et al. (2010) encontraron que vacas sanas presentan un valor medio  $29,57 \pm 6,32$  U/L. Los valores evidenciados dentro de este estudio se encuentran dentro del rango informado por Kaneko et al. (2008) y coinciden con los hallados por Sahinduran et al. (2010). Los resultados obtenidos coinciden con el comportamiento de esta enzima comunicado por Liu et al. (2012) al inicio de la lactancia, con menores concentraciones al momento del parto que aumentan gradualmente al



avanzar los días posparto, lo cual puede estar explicado en los cambios fisiológicos y químicos que ocurren en el hígado de vacas de alto rendimiento durante la lactancia temprana para favorecer la producción de leche durante un periodo de balance energético negativo (Stojevic et al., 2005). Sahinduran et al. (2010) encontraron que vacas lecheras con cetosis aumentan significativamente la concentración de ALT en comparación con vacas sanas, asociándolo a disfunción hepática, mientras que Yameogo, et al. (2008) hallaron valores similares entre animales con cetosis clínica, subclínica y animales sanos, indicando que animales con cetosis pueden no haber desarrollado un daño hepático considerable al momento de la realización del estudio.

La ALT cataliza la transferencia reversible de un grupo amino entre L- alanina y  $\alpha$ -cetoglutarato para formar piruvato y L-glutamato, el cual tiene un papel importante en la gluconeogénesis y el metabolismo de aminoácidos (Liu et al., 2014). La ALT se encuentra distribuida en diferentes órganos y tejidos del cuerpo, principalmente en el hígado donde se ubica en el citosol de los hepatocitos (Liu et al., 2012). El incremento en plasma sanguíneo de ALT se considera un indicador de cambios en la función hepática donde mayores valores de esta enzima podrían ser atribuidos a lesiones en el hígado (Liu et al., 2014). En el presente experimento no se presentaron valores que indiquen problemas hepáticos relacionados con la concentración de ALT, sin embargo se encontraron menores valores en T2 y T3. Esto puede estar relacionado con el menor metabolismo lipídico que se presentó en el hígado de los animales pertenecientes a estos grupos al evidenciar menores valores de NEFA, BHB y cetonas. Diferentes estudios indican que una alta movilización de reservas corporales (la cual se refleja en la concentración sérica de NEFA y BHB) va a conllevar a la infiltración de grasa en los hepatocitos y por tanto estos van a perder funcionalidad, provocando que se libere ALT desde estas células y se incremente la concentración sérica de esta enzima (Bobe et al., 2004).

Para aspartato aminotransferasa (AST), se presentaron diferencias estadísticas en los días 0 y 15 posparto (tabla 5) con los valores más altos del experimento (Gráfica 3-B). Los valores medios para cada uno de los grupos fueron de  $64,03 \pm 6,33$  U/L para T1,  $65,89 \pm 3,92$  U/L para T2 y  $65,88 \pm 4,37$ U/L para T3. No se presentaron diferencias estadísticas entre los grupos dado que el objetivo principal fue buscar los mejores indicadores que pudieran ser asociados a cetosis y resistencia insulínica.

Valores de referencia para AST se encuentran entre 78 y 132 U/L (Kaneko et al., 2008). Los valores hallados en este trabajo se encuentran por debajo de los valores indicados anteriormente, aunque coinciden con los valores planteados por Stovejic et al. (2005) y Józwik et al. (2012) para vacas lecheras. Liu et al (2012), en su estudio realizado en vacas Holstein durante el posparto, presenta un comportamiento similar en la concentración de AST que el hallado en el presente experimento presentando los valores más altos en el posparto temprano para luego disminuir y volver a aumentar después de la semana 8 posparto.

La AST cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al  $\alpha$ -cetoglutarato para formar oxalacetato y glutamato, siendo una de las principales reacciones del metabolismo proteico, y participando en reacciones de obtención de energía en el organismo (Józwik et al., 2012). La AST es una enzima intracelular que se encuentra en el citoplasma y en mayor cantidad en las mitocondrias, su actividad se produce en diferentes tejidos, incluidos el hepático, cardíaco, renal, músculo esquelético y en los eritrocitos (Liu et al., 2012). Altos niveles de AST han sido ampliamente usados como indicadores de insuficiencia hepática en vacas lecheras (Liu et al., 2012).

**Tabla 5. Significancia estadística asociada a las enzimas hepáticas.**

Variable	Modelo	Grupo	Periodo	Grupo*Periodo	Covarianza
ALT	<0,0001	0,0362	<0,0001	0,0099	NS*
AST	<0,0001	0,8835	0,0002	0,2425	NS

Cuando  $p < 0,05$  se considera que existen diferencias estadísticas, \* NS indica que en el primer ensayo estadístico realizado la covarianza no fue significativa y por tanto fue retirada del modelo para ese metabolito.

La actividad de ALT y AST es considerada como un biomarcador que permite estimar la lesión hepática de las vacas y la síntesis de proteínas, tanto albumina y globulinas, las cuales dependen en gran medida del estado funcional del hígado (Liu et al., 2014). En el presente estudio todos los animales presentaron valores inferiores al límite superior informado (Kaneko et al., 2008) y por tanto se puede intuir que no se presentaron problemas hepáticos en ninguno de los grupos experimentales. Incremento en la

actividad de enzimas hepáticas incluidas ALT y AST, se relaciona con lipidosis hepática, congestión venosa pasiva, y enfermedades que causan distensión del rumen o el abomaso (Sahinduran et al., 2010). En el parto de vacas lecheras se presenta movilización de las reservas corporales para satisfacer las altas necesidades energéticas de este periodo, sin embargo la movilización lipídica excesiva puede conllevar a la presentación de cetosis que puede estar acompañada de infiltración grasa en las células del hígado, generando lipidosis hepática (Gross et al., 2013). Según el grado de daño o muerte hepatocelular la AST y ALT van a incrementar su concentración fuera del hígado, es decir, a mayor lipidosis hepática, mayor nivel de estas enzimas se encontrará en sangre (Bobe et al., 2004).

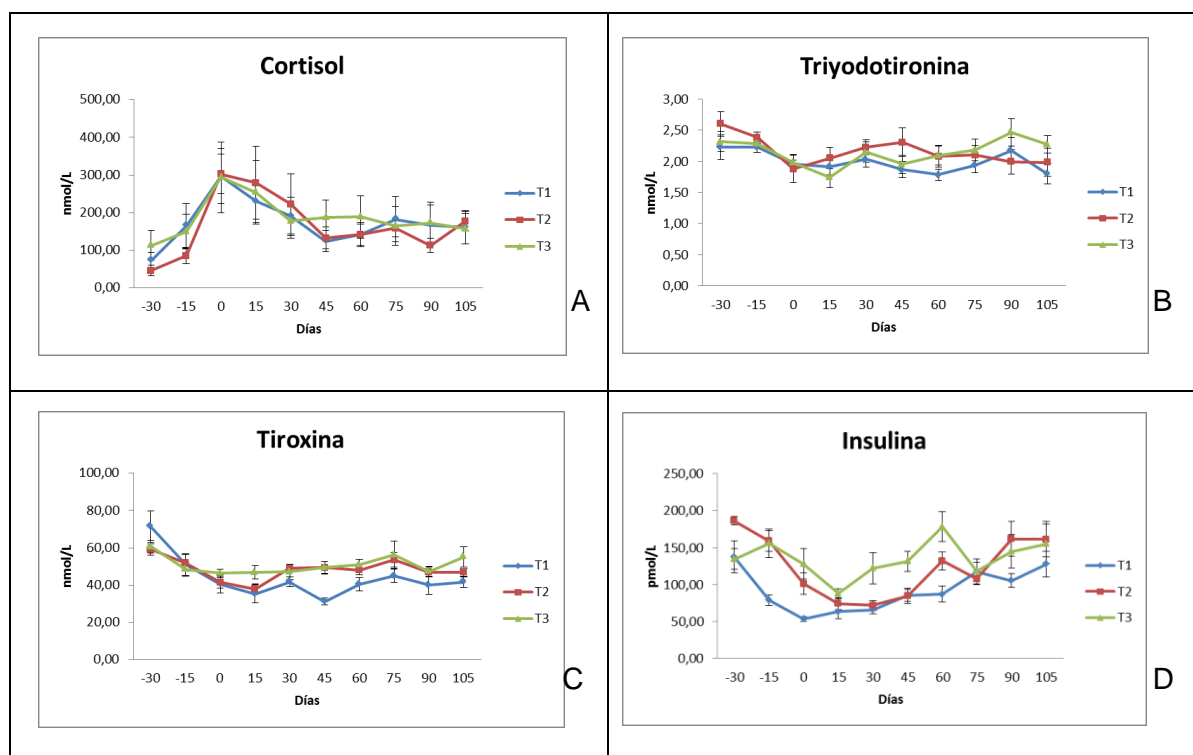
### 3.4 Metabolismo Hormonal

Los valores medios y la desviación estándar para cada una de las hormonas en los grupos experimentales y periodos evaluados se encuentran en el Anexo D.

Asumiendo que existe una liberación fisiológica de cortisol al parto, se esperaría que la suplementación mineral o vitamínica afectara la secreción de cortisol, lo cual en el presente trabajo no se observó. La mayor concentración de cortisol se encontró al día del parto siendo diferente estadísticamente de los demás periodos (tabla 6). El siguiente valor más alto de esta hormona fue hallado en el día 15 posparto también con diferencias significativas frente a los otros periodos, mientras los menores valores se presentaron en la fase preparto con la concentración más baja de cortisol en el día -30 seguida del día -15. Los valores medios fueron para T1 de  $127,49 \pm 60,24$  nmol/L, para T2 de  $146,04 \pm 81,82$  nmol/L, y T3 con  $90,99 \pm 52,14$  nmol/L. En la interacción grupo – periodo se encontraron diferencias significativas en T2 en los días 0 y 15 posparto, y en T1 en el día 0 con los valores más altos del experimento en comparación con los demás grupos en cada periodo (Gráfica 4-A).

Los valores hallados en el presente estudio son similares a concentraciones de cortisol encontradas por Moyes et al. (2009) entre 100 y 600 nmol/L y Zebeli et al. (2011) entre 55 y 413 nmol/L. El cortisol presenta un comportamiento característico en el periodo de

transición, evidenciando un marcado aumento en el periodo cercano al parto y disminuyendo gradualmente en el posparto (Zebeli et al., 2011; Drackley et al., 2005). Una tendencia similar fue hallada en el presente trabajo, donde los tres grupos experimentales evidenciaron valores altos al momento del parto y durante el posparto temprano, mientras que en el preparto y después del día 45 posparto exhibieron una menor concentración de la hormona.



**Gráfica 4. Comportamiento de las hormonas medidas para los tres grupos experimentales desde el día 30 antes del parto hasta el día 105 posparto. Concentración sanguínea de A. Cortisol (nmol/L), B. Triyodotironina (nmol/L), C. Tiroxina (nmol/L), D. Insulina (pmol/L).**

El periparto y sus desafíos metabólicos constituyen un periodo potencialmente estresante para las vacas de alta producción de leche, donde estos animales se enfrentan al desafío de mantener la homeostasis en medio de un aumento en los requerimientos nutricionales, mientras disminuye su consumo de alimento y se encuentra en estado de

inmunosupresión, sumado a otros factores como el estrés por calor, mala ventilación, problemas podales o infecciosos, y cambio en las prácticas de manejo habituales (Drackley et al., 2005). Los tratamientos suministrados en el presente experimento se asocian a garantizar una mejor adecuación de las vías bioquímicas que favorezcan la homeostasis y reduzcan la inmunosupresión.

Los animales reaccionan al estrés con respuestas fisiológicas y de comportamiento, las cuales son resultado de la reactividad individual del animal y están determinadas por su capacidad de adaptación (Romero et al., 2015), por lo cual se explicaría la alta variación encontrada en la concentración de esta hormona en el presente trabajo.

La respuesta fisiológica al estrés consiste en la activación de los sistemas nervioso central, endocrino e inmunológico, que se encuentran conectados a través del sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por la secreción de neuropéptidos y neurohormonas que son responsables de los cambios en la respuesta inmune humoral y celular (Romero et al., 2015). Durante el parto los niveles de cortisol aumentan debido a todos los cambios que se presentan con la finalidad de garantizar el suministro de nutrientes para la producción de leche y asegurar la sobrevivencia del ternero antes y después del nacimiento, después del parto temprano, la concentración de cortisol disminuye como muestra de adaptación a estos cambios y de regulación homeostática (Drackley et al., 2005).

La medición de la concentración plasmática de cortisol ha sido usada ampliamente para determinar la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y así evaluar la respuesta de los animales ante situaciones de estrés (Huzzey et al., 2011; Romero et al., 2015). Los glucocorticoides como el cortisol afectan el metabolismo de los carbohidratos, estimulando la gluconeogénesis con la finalidad de aportar energía como apoyo a la respuesta de estrés, además puede intervenir en la síntesis y liberación de citoquinas que actúan como mediadoras de reacciones inmunes e inflamatorias, o alterar la función de las células periféricas del sistema inmune como los linfocitos, los monocitos y los macrófagos (Huzzey et al., 2011).

Para triyodotironina se encontró que la concentración más alta estuvo en el día -30, seguido de los días -15, 30, 45 y 90, con diferencias significativas frente a los demás periodos (tabla 6), mientras el valor más bajo se presentó en el día 15. En la interacción

grupo – periodo el mayor valor del experimento fue para T2 en el día -15 difiriendo estadísticamente de los demás valores, mientras en los días 60 y 105 de T1 y el 15 de T3 se presentaron los menores valores también con diferencias significativas frente a las demás concentraciones de esta hormona (Gráfica 4-B). Los valores medios hallados fueron de  $2,02 \pm 0,17$  nmol/L en T1,  $2,21 \pm 0,22$  nmol/L para T2 y  $2,10 \pm 0,21$  nmol/L en T3.

Se esperaba encontrar mayor concentración en T2, si bien no se presentó diferencia estadística significativa entre los grupos, la tendencia observada muestra que los tratamientos en los cuales se realizó suplementación presentan mayor concentración de triyodotironina, igualmente, T2 presentó una mayor producción de leche, la cual podría ser asociada a un mejor estado metabólico proporcionado por el yodo.

Campos y Giraldo (2008) plantean que concentraciones normales de triyodotironina en bovinos adultos se encuentran entre 1,80 y 1,90 nmol/L. Tadayonfar y Noaman (2013) indican como valor crítico 2,00 nmol/L, determinando que valores por debajo de esta concentración indican deficiencia de triyodotironina en el organismo. Mahebbi-fani et al. (2008) hallaron valores entre 1,07 y 1,64 nmol/L, con una tendencia definida, mayores concentraciones en el periodo seco que disminuyen en la etapa del parto y aumentan lentamente mientras la lactancia transcurre. Resultados similares fueron obtenidos por Van Kneysel et al. (2007) con mayores valores al parto en comparación con el posparto. En la presente investigación se encontró un comportamiento similar al publicado por Mahebbi-fani et al. (2008) y Van Kneysel et al. (2007), aunque los valores hallados fueron superiores a los presentados por estos autores, coincidiendo con los resultados de Djokovic et al. (2007), los cuales hallaron valores entre 2,31 y 2,58 nmol/L al final de la preñez, y valores entre 1,58 y 2,22 nmol/L en el puerperio de vacas de Holstein, estos hallazgos podrían asociarse a la producción de leche de los animales experimentales.

La triyodotironina es una hormona tiroidea, de la cual una pequeña cantidad es secretada por la glándula tiroides, mientras alrededor del 80% de esta hormona es sintetizada a través de la desyodación de la tiroxina por fuera de la glándula (Tadayonfar y Noamar, 2013). Para la conversión de tiroxina a triyodotironina es necesaria la presencia de la enzima 5'deyodasa (5'D), la cual se encuentra presente en varios órganos,

especialmente el hígado, la glándula mamaria, el intestino y el cerebro (Mahebbi-fani et al., 2008; Huszenicza et al., 2002). La concentración de triyodotironina está influenciada principalmente por la actividad de la enzima 5'D, la cual se encuentra en dos formas diferentes en los tejidos, la tipo I predominante en el hígado, y la tipo II que se encuentra principalmente en la glándula mamaria (Huszenicza et al., 2002).

En el inicio de la lactancia la actividad de la 5'D tipo II se hace más eficiente que la 5'D tipo I (la cual es más activa durante el periodo seco) dando apoyo a la glándula mamaria para la producción de leche y afectando la síntesis de triyodotironina en otros tejidos, lo cual explicaría la menor concentración de esta hormona al momento del parto y en el inicio de la lactancia, además de la influencia de otros factores como la reducción en el consumo de alimento y factores ambientales como la temperatura (Huszenicza et al., 2002; Djokovic et al., 2007).

La mayor concentración de tiroxina se encontró en el día -30, seguido del día -15 y 75 con diferencias significativas frente a los demás periodos (tabla 6), mientras los menores valores se hallaron en los días 0 y 15. En la interacción grupo – periodo los tres tratamientos presentaron su mayor concentración en el día -30 con diferencias significativas frente a las demás interacciones. Por otra parte, T1 en el día 45 también difirió estadísticamente con la menor concentración de tiroxina en el experimento (Gráfica 4-C). Los valores medios hallados fueron de  $44,26 \pm 10,99$  nmol/L para T1,  $49,29 \pm 5,93$  nmol/L para T2 y  $49,75 \pm 4,90$  nmol/L para T3.

Djokovic et al. (2007) plantean valores de tiroxina entre 45,28 y 50,68 nmol/L al final de la gestación y entre 35,06 y 45,75 nmol/L al inicio de la lactancia en vacas lecheras, mientras Tadayonfar y Noaman (2013) plantean que concentraciones inferiores a 38 nmol/L son consideradas patológicas, indicando deficiencia de la hormona. La tiroxina presenta un comportamiento similar a la triyodotironina, exhibiendo concentraciones altas en el preparto y bajas en el posparto temprano para recuperarse de manera gradual a medida que avanza la lactancia (Huszenicza et al., 2002), comportamiento que fue observado en el presente trabajo y coincide con los resultados obtenidos por Mohebbi-fani et al. (2008) y Van Knegsel et al. (2007). Los valores obtenidos coinciden con los valores encontrados por Djokovic et al. (2007). Tadayonfar y Noamar (2013) también encontraron concentraciones similares a las observadas en el presente estudio, en un rango entre 44,07 y 47,13 nmol/L.

La tiroxina es una hormona tiroidea, la cual es sintetizada y secretada en gran cantidad por la glándula tiroides en una forma inactiva (Mahebbi-fani et al., 2008). Fuera de la tiroides la tiroxina es alterada para convertirse en su forma activa (triyodotironina) con la intervención de la enzima 5'D (Huszenicza et al., 2002). Las vacas al final de la gestación e inicio de la lactancia tienen una mayor demanda metabólica y un menor consumo de alimento, provocando un balance energético negativo que está asociado a la disminución en la concentración de tiroxina (Djokovic et al., 2007). Las alteraciones en la concentración de tiroxina en plasma se encuentran estrechamente relacionadas con el balance de energía y el metabolismo, reflejando cambios en la regulación de la tasa de secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH, la cual es la encargada de la secreción de la tiroxina desde la glándula tiroides), o del balance entre la activación e inactivación enzimática de la tiroxina fuera de la glándula tiroides (Huszenicza et al., 2002). Cuando se presenta una alta demanda metabólica se acelera la conversión de tiroxina (prohormona activa) a triyodotironina (hormona activa) con la finalidad de mantener la homeostasis del organismo (Mahebbi-fani et al., 2008).

La actividad hormonal de la glándula tiroides tiene un importante rol en el periodo de transición, ya que determina la intensidad del metabolismo celular, el metabolismo de lípidos y de carbohidratos y el desempeño de la lactancia, por medio de sus hormonas tiroideas (Djokovic et al., 2007). La concentración sanguínea de tiroxina y triyodotironina se encuentra influenciada por una variedad de factores ambientales como la temperatura, o fisiológicos y de manejo como el consumo de alimento y la composición de la dieta (Huszenicza et al., 2002). El contenido de yodo de la dieta puede afectar la concentración de las hormonas tiroideas, ya que este mineral es uno de sus principales constituyentes, y teniendo en cuenta que las hormonas tiroideas cumplen funciones en el desarrollo neuronal y sexual, en la regulación térmica, la regulación del metabolismo y el estado energético, la deficiencia de yodo en el posparto de vacas de alta producción va a generar problemas tanto productivos como reproductivos (Tadayonfar y Noaman, 2013).

En el presente estudio se encontró una asociación positiva y significativa entre tiroxina y triyodotironina ( $r = 0,43$ ;  $p < 0,0001$ ), coincidiendo con otros autores como Djokovic et al. (2007) y Mohebbi-fani et al. (2008). Según el anterior resultado mediante la evaluación de una de estas hormonas se podría analizar la actividad tiroidea en el organismo, y esta correlación estaría explicada en la base molecular de estas hormonas, donde la tiroxina



es la forma inactiva de la triyodotironina y en condiciones normales se debe dar la conversión entre estas hormonas para que se cumpla su función biológica (Huszenicza et al., 2002). La concentración de hormonas tiroideas ha sido ampliamente asociada con el balance energético de las vacas, animales en balance energético negativo presentan concentraciones bajas de tiroxina y triyodotironina, mientras animales que han pasado los primeros tres meses de lactancia y se encuentran en un balance energético positivo han presentado mayores concentraciones de estas hormonas (Mohebbi-fani et al., 2008). Así mismo, se ha asociado también la concentración de hormonas tiroideas con la producción de leche, pero en este caso en una forma negativa, es decir, a mayores niveles de tiroxina y triyodotironina menor ha sido la producción de leche (Huszenicza et al., 2002).

En la insulina se encontró que los periodos con mayores valores se presentaron al inicio y al final del experimento, con altas concentraciones en el preparto, donde el mayor valor se halló en el día -30 seguido del -15, para volver a encontrar valores altos después del día 60 hasta el 105, evidenciando diferencias significativas con los periodos de menor concentración de insulina que se encontraron entre los días 0 y 45 posparto (tabla 6). Entre los grupos se encontró que T1 con  $91,73 \pm 28,66$  pmol/L se diferenció estadísticamente de T2 y T3 con  $130,16 \pm 41,47$  pmol/L y  $132,84 \pm 24,90$  pmol/L, respectivamente. En la interacción grupo – periodo se evidenciaron las mayores concentraciones en T2 para los días -30 y 90, y en T3 para el día 60 difiriendo estadísticamente de las demás interacciones, mientras las menores concentraciones fueron halladas para T1 en los días -15, 0, 15, 30, 45 y 60, para T2 en los días 15, 30, y 45 mientras para T3 en día 15 (Gráfica 4-D).

Lee et al. (2012) plantea valores de insulina para el periodo preparto (10 días antes del parto) de  $144,56 \pm 89,49$  pmol/L, mientras a los 14 días posparto determina valores de  $34,42 \pm 32,69$  pmol/L, y a los 28 días de  $43,03 \pm 43,03$  pmol/L. Por otra parte, Kawashima et al. (2007) indican valores en preparto entre 77,45 y 137,68 pmol/L, y en el posparto temprano entre 43,03 y 86,05 pmol/L. Komatsu, et al. 2014, plantea que la concentración de insulina varía dependiendo de la etapa fisiológica en la que se encuentren las vacas, animales no lactantes van a evidenciar mayores concentraciones de insulina que animales que se encuentran en el pico de lactancia donde se encontraran los menores valores de esta hormona, mientras en la mitad de la lactancia se encontraran valores intermedios, resultados similares fueron obtenidos por Lee et al.

(2012) y Kawashima et al. (2007). En el presente estudio también se evidenció el comportamiento característico de esta hormona con la mayor concentración en el periodo parto y los menores valores después del día 15 posparto. Este comportamiento se explica por la alta demanda de glucosa por parte de la glándula mamaria en el inicio de la lactancia, por tanto se presenta una reducción en la síntesis de insulina en el páncreas y una reducción en la respuesta a la insulina en el tejido muscular y adiposo, para asegurar que la cantidad de glucosa requerida para la producción de leche en este periodo (Zachut et al., 2013).

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células  $\beta$  en los islotes de Langerhans en el páncreas como respuesta a niveles elevados de nutrientes en la sangre (Olivares y Arellano, 2008). Su principal función es mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal favoreciendo la entrada de este metabolito al musculo y al tejido adiposo, y en hígado participa en la inhibición de su producción, además, participa en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Olivares y Arellano, 2008).

En bovinos, especialmente vacas de producción de leche, se generan múltiples adaptaciones en la etapa final de la preñez y la lactancia temprana, donde la insulina juega un papel fundamental en todos los ajustes fisiológicos que se presentan (Zachut et al., 2013). La concentración de insulina durante el periodo de transición se disminuye, favoreciendo la movilización de ácidos grasos a partir del tejido adiposo, pasando de un estado lipogénico a un estado lipolítico, acompañado de una disminución en la absorción y oxidación de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina para asegurar mayor aporte de este metabolito a la glándula mamaria para producción de leche (Gross et al., 2011). Los cambios que se presentan alrededor de la insulina durante este periodo están determinados por dos factores, el primero es la reducción en la síntesis y liberación de la hormona desde los islotes de Langerhans y el segundo, la disminución en la sensibilidad de los tejidos a la hormona, generando un estado de resistencia insulínica (Zachut et al., 2013). La reducción en la acción de la insulina en un periodo de alta demanda energética y bajo consumo de alimento, favorece la alta movilización de reservas grasas que van circulan en el torrente sanguíneo en forma de NEFA y llegan al hígado para proporcionar energía al animal. Sin embargo, cuando son excesivos y no se logran metabolizar

completamente pueden llevar a la presentación de cetosis e hígado graso (Gross et al., 2011).

**Tabla 6. Significancia estadística para las hormonas analizadas**

Variable	Modelo	Grupo	Periodo	Grupo*Periodo	Covarianza
Cortisol	<0,0001	0,2277	<0,0001	0,0031	NS*
Triyodotironina	<0,0001	0,4436	<0,0001	0,0028	0,0438
Tiroxina	<0,0001	0,0942	<0,0001	0,0293	0,0018
Insulina	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0118

Cuando  $p < 0,05$  se considera que existen diferencias estadísticas, \* NS indica que en el primer ensayo estadístico realizado la covarianza no fue significativa y por tanto fue retirada del modelo para ese metabolito.

Los grupos suplementados presentaron mayores valores de insulina, lo cual puede deberse al suministro de yodo en los dos tratamientos (T2 y T3), ya que mayores concentraciones de hormonas tiroideas han sido asociadas a una mayor síntesis de insulina (Morales y Rodríguez, 2005). El proceso mediante el cual las hormonas tiroideas participan en la síntesis de insulina en la lactancia temprana puede estar mediado por el eje IGF-I (factor de crecimiento similar a la insulina tipo I)/GH (hormona de crecimiento) (Huszenicza et al., 2002). Las hormonas tiroideas estimulan la producción hepática de IGF-I (Huszenicza et al., 2002), que en una alta concentración va a generar retroalimentación negativa sobre la secreción de GH hipofisiaria (Robson et al., 2002), la cual actúa como un agente inhibidor de la secreción de insulina durante el posparto temprano (Gross et al., 2011). Así, al disminuirse la concentración de GH en sangre se estaría favoreciendo la secreción de insulina en el páncreas y por tanto podrían encontrarse mayores concentraciones sanguíneas de esta hormona.

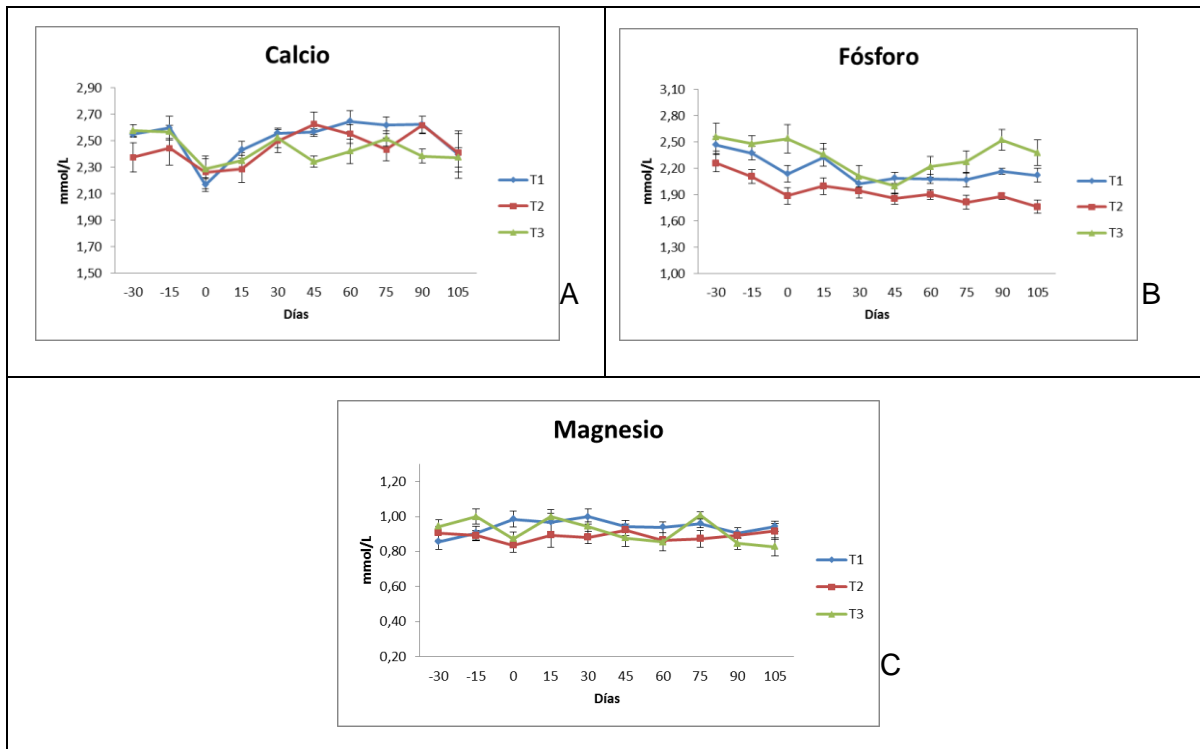
En el suplemento suministrado a los animales de T3 estaba incorporado también el cinc, el cual es un mineral que da estabilidad a la molécula de insulina. Este mineral dentro de las células permite a la insulina formar un dímero que es la forma de almacenamiento y secreción de esta molécula, ayudando a prolongar su vida media y potenciar su

capacidad de acción (Granados et al., 2014), lo cual también podría haber favorecido la mayor concentración de insulina en este grupo. Así mismo, ha sido establecido, que para la secreción de insulina desde los islotes de Langerhans es necesario el calcio, ya que las células  $\beta$  son excitables eléctricamente, y responden al uso de señales eléctricas en el cambio de concentración de glucosa en la sangre estimulando o inhibiendo la secreción de la hormona, por tanto el proceso de liberación de insulina es calcio dependiente. Por tanto, disfunciones en el canal de calcio estarán asociadas a menores concentraciones de insulina. El suministro de este mineral en T3 puede entonces haber favorecido también la mayor concentración de la insulina en sangre (Jing et al., 2005).

Las hormonas que no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos no se discutieron ya que el experimento se enfocó en la búsqueda de indicadores que permitieran determinar con mayor precisión situaciones asociadas a cetosis y resistencia insulínica.

### 3.5 Metabolismo Mineral

Para Calcio se encontró que para el día del parto se presentaron valores en límite inferior, según lo informado por Kaneko et al., 2008, sin que se presentaran signos clínicos de hipocalcemia; en este día se presentó la menor concentración durante el experimento para los tres grupos, difiriendo estadísticamente de los demás periodos (tabla 7). Los siguientes valores bajos se hallaron en los días 15 y 105 posparto también con diferencias significativas frente a los otros periodos experimentales (Gráfica 5-A). Los valores medios encontrados para los grupos fueron de  $2,52 \pm 0,14$  mmol/L para T1,  $2,45 \pm 0,13$  mmol/L para T2 y  $2,43 \pm 0,10$  mmol/L en T3 sin diferencias estadísticamente significativas.



**Gráfica 5. Comportamiento de los minerales para los tres grupos experimentales desde el día 30 antes del parto hasta el día 105 posparto. Concentración sanguínea de A. Calcio (mmol/L), B. Fósforo (mmol/L), C. Magnesio (mmol/L).**

Valores de referencia informados para este mineral se encuentran entre 2,43 y 3,10 mmol/L (Kaneko et al., 2008). Cozzi et al. (2011) determinó un rango de referencia entre 2,2 y 2,4 mmol/L para vacas Holstein, mientras que Campos et al. (2007) encontraron valores de 1,52 hasta 2,12 en animales de la misma raza en condiciones de trópico. Por otra parte, Quiroz et al. (2009) indica valores en el preparto de 2,18 a 2,65 mmol/L y durante el posparto entre 1,64 y 2,61 mmol/L para vacas lecheras. Aunque algunos de los valores hallados en el presente trabajo se encuentran por debajo de los indicados por Kaneko et al. (2008), coinciden con los hallados por Cozzi et al. (2011) para vacas Holstein. Durante el experimento se presentó una tendencia similar en la concentración de calcio de los tres grupos experimentales con una marcada disminución al momento del parto y aumento gradual en el periodo posparto, comportamiento que ha sido planteado también por otros autores para este mineral (Quiroz et al., 2009; Oetzel, 2013).

El calcio es un mineral de gran importancia, ya que es un catión que cumple funciones estructurales en el organismo siendo constituyente de huesos y dientes, además de que cumple funciones fisiológicas dentro y fuera de las células (El-Samad et al., 2002). El calcio intracelular participa en la activación de diferentes enzimas y en la transmisión de información desde la superficie hasta el interior de la célula (El-Samad et al., 2002), mientras el calcio extracelular participa en la excitabilidad neuromuscular, actuando sobre las fibras musculares y nerviosas, para contribuir en la función musculo-esquelética y en la motilidad gastrointestinal (Oetzel, 2013), participando también en la coagulación de la sangre y la secreción de diferentes hormonas (El-Samad et al., 2002).

Debido a la acción multifuncional del calcio en el organismo, este mineral debe mantenerse bajo un estricto control homeostático que hace que su concentración permanezca en un rango estrecho (Oetzel, 2013). Cuando la demanda de calcio plasmático aumenta, la homeostasis del calcio se logra a través de la resorción de este mineral del hueso, de la absorción intestinal y de la reabsorción renal para incorporarlo a la sangre. Por esta razón, la concentración sérica de calcio en animales sanos debe permanecer sin mayor variación independientemente del aporte del mineral en la dieta (El-Samad et al., 2002), lo cual podría explicar por qué los niveles de calcio del grupo con suplementación de este mineral no presentaron diferencias significativas con los otros dos grupos. Concentraciones inadecuadas de calcio pueden causar disminución en el consumo de alimento, baja motilidad ruminal e intestinal, mayor susceptibilidad a enfermedades metabólicas e infecciosas, y en casos graves puede llevar a las vacas a presentar hipocalcemia del periparto (Goff, 2008).

En el inicio de la lactancia las vacas se ven desafiadas a mantener una concentración normal de calcio, debido a que tanto el calostro producido en los primeros días posparto como la leche producida posteriormente tienen un alto contenido de este mineral, el cual ha sido direccionado desde la circulación periférica a la glándula mamaria, reduciendo así su concentración sanguínea (Oetzel, 2013). La concentración de calcio debe volver lo más rápido posible a sus niveles normales en el posparto temprano, sin embargo, cuando las vacas no logran normalizar la concentración de este mineral se altera la función muscular y nerviosa resultando en un trastorno metabólico conocido como fiebre de leche, paresia puerperal o hipocalcemia del periparto (Overton y Waldron, 2004). Se ha observado que en vacas de producción lechera se presenta la menor concentración

de calcio entre las 12 a 24 horas posparto, con un alto riesgo de que se produzca fiebre de leche si el animal no logra utilizar hábilmente los mecanismos programados para lograr la normocalcemia (Goff, 2008). En el trabajo realizado se evidenció la disminución en la concentración de calcio al momento del parto en los tres grupos, lo cual puede estar explicado por el direccionamiento del calcio a la glándula mamaria para la producción de calostro, sin embargo, los niveles de calcio se normalizaron rápidamente en el posparto temprano.

En la concentración de fósforo sérico, T1 y T3 presentaron diferencias significativas con T2. Los valores medios fueron  $2,19 \pm 0,15$ ;  $1,94 \pm 0,15$  y  $2,34 \pm 0,19$  mmol/L para T1, T2 y T3 respectivamente. En los periodos se halló que en el preparto se presentaron los valores más altos de fósforo, seguidos de los días 0, 15 y 90, evidenciando diferencias significativas con los demás periodos (tabla 7). En la interacción grupo-periodo se encontraron valores superiores en T3 durante los días -30, -15, 0, 15, 60, 75, 90 y 105, en T1 en los días -30, -15, 0 y 90, mientras en T2 para el día -30, mostrando diferencias estadísticamente significativas con los otros periodos en los tres grupos (Gráfica 5-B).

Concentraciones normales de fósforo en suero se encuentran entre 1,81 y 2,10 mmol/L (Kaneko et al., 2008). Para vacas Holstein se han encontrado valores de referencia entre 1,40 y 2,10 mmol/L (Cozzi et al., 2011), mientras que en condiciones de trópico para esta raza de animales se han hallado concentraciones entre 1,03 y 1,83 mmol/L (Campos et al., 2007). En el presente trabajo, para T1 y T3 se encontraron valores por encima de los rangos superiores presentados por Kaneko et al. (2008), Cozzi et al. (2011) y Campos et al. (2007), mientras T2 tan solo en el periodo 1 (día -30) presentó una concentración mayor al límite superior para normalizarse desde el periodo 2 (día -15) hasta el final del experimento. Trabajos realizados por Wang et al. (2014) y Peterson et al. (2005) determinaron que a mayor aporte de fósforo en la dieta, mayor es la concentración sérica de este mineral, resultado similar al obtenido en el presente trabajo, donde T3 fue el grupo que recibió un tipo de suplementación que incluía fósforo, y fue el grupo que evidenció mayor concentración sanguínea de este mineral. La adecuada concentración de fósforo hallada en T2, podría indicar que la suplementación con yodo favorece indirectamente su metabolismo, al permitir un mejor funcionamiento de la tiroides y las hormonas producidas en esta glándula, favoreciendo ya sea la resorción o la captación de minerales por el hueso, ya que casos de hipotiroidismo han sido asociados a la alteración en el metabolismo del hueso (Heemstra et al., 2008).

El fósforo participa en diferentes procesos metabólicos siendo constituyente de los huesos, los dientes y diferentes moléculas como el adenosina-trifosfato (ATP), intermediarios metabólicos fosforilados y los ácidos nucleicos, además de estar involucrado en la síntesis de fosfolípidos y fosfoproteínas (Soetan et al., 2010; Wang et al., 2014). El fósforo también cumple funciones de efecto tampón en los fluidos corporales (Soetan et al., 2010). En los rumiantes el fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento y la funcionalidad de los microorganismos ruminales, por tanto, la tasa de fermentación ruminal, la síntesis de proteína y la digestibilidad de la materia orgánica se ven afectadas por la insuficiencia de este mineral en la dieta (Puggaart et al., 2014; Soetan et al., 2010). Durante el periodo de transición es común que en las vacas de alta producción se presente deficiencia de fósforo, afectando la producción de leche, la actividad reproductiva y el consumo de alimento (Puggaart et al., 2014). En el presente trabajo no se observó este comportamiento, permitiendo deducir que el aporte de fósforo de la dieta logra suplir los requerimientos de los animales. Sin embargo, se observa que durante los días 30 y 60 posparto se presenta una considerable disminución en su concentración sanguínea, periodo cercano al pico de producción de leche donde el flujo de nutrientes a la glándula mamaria debe ser mayor para la síntesis láctea. Altos niveles en la concentración de fósforo en el organismo conllevan a un exceso en la excreción de este mineral, lo cual contribuye a la eutrofización de las vías fluviales (Wang et al., 2014). Además, se considera como un factor predisponente a la presentación de fiebre de leche en las vacas durante el posparto temprano, debido a que los mecanismos de control en la homeostasis del calcio están estrechamente relacionados con la regulación del fósforo (Lean et al., 2013).

Para magnesio se encontró que los días -15, 15, 30 y 75 presentaron los valores más altos de este mineral difiriendo estadísticamente de los otros periodos (tabla 7). En la interacción grupo- periodo se halló que en T3 días -30, -15, 15, 30 y 75 presentaron los mayores valores, seguidos de T1 en los días 0, 15, 30, 45, 60, 75, 105, y T2 en el día 45, con diferencias estadísticas con los demás periodos en los tres grupos (Gráfica 5-C). Los valores medios hallados para T1 fueron  $0,94 \pm 0,04$  mmol/L, para T2 de  $0,89 \pm 0,03$  mmol/L y en T3 de  $0,92 \pm 0,07$  mmol/L.

El rango de referencia para este mineral se encuentra entre 0,74 y 0,95 mmol/L según Kaneko et al. (2008), mientras que Goff (2008) indica que valores entre 0,75 y 1,00



mmol/L se consideran normales, y Cozzi et al. (2011) determina valores normales en vacas Holstein entre 0,79 y 1,07 mmol/L. Todos los valores hallados en el presente estudio se encuentran dentro del rango comunicado por Goff (2008) y Cozzi et al. (2011), y no presentan mayores diferencias con los valores determinados por Kaneko et al. (2008). Las diferencias estadísticas encontradas entre los periodos pueden deberse a la inestabilidad en el consumo de alimento en esta fase productiva de las vacas lo cual genera un menor aporte de magnesio a partir de la dieta (Onita y Colibar, 2009). No se encontró una tendencia definida hacia el ascenso o descenso en la concentración de este mineral durante la fase experimental.

El magnesio es importante en el metabolismo del hueso, en la funcionalidad del cerebro y los nervios, en la homeostasis del calcio y la irritabilidad muscular, además participa en la regulación de glucosa en sangre y en el metabolismo de grasas y carbohidratos (Zhang et al., 2011; Soetan et al., 2010). El magnesio también juega un papel importante en la homeostasis del calcio alrededor del parto, estimulando la liberación de la hormona paratiroidea, la síntesis de vitamina D en su forma activa (1,25-dihidroxi-colecalciferol), y participando en una menor excreción renal de calcio, indicado que concentraciones normales de magnesio disminuyen el riesgo de que se presente fiebre de leche (Lean et al., 2013).

**Tabla 7. Significancia estadística para minerales séricos.**

Variable	Modelo	Grupo	Periodo	Grupo*Periodo	Covarianza
Calcio	<0,0001	0,4930	<0,0001	0,0559	NS*
Fósforo	<0,0001	0,0008	<0,0001	0,1087	NS
Magnesio	<0,0001	0,2799	0,0202	0,0056	NS

Cuando  $p < 0,05$  se considera que existen diferencias estadísticas, \* NS indica que en el primer ensayo estadístico realizado la covarianza no fue significativa y por tanto fue retirada del modelo para ese metabolito.

La regulación del calcio, el fósforo y el magnesio comparte mecanismos homeostáticos, generando que los cambios en la concentración sérica de estos minerales puedan estar relacionados entre sí (Russell y Roussel, 2007). Una proporción significativa de estos

minerales se encuentra en el hueso, mientras la cantidad circulante de cada uno de estos minerales es una pequeña fracción del contenido total que se encuentra en el cuerpo (Russell y Roussel, 2007, Lean et al., 2013).

El calcio sérico se encuentra distribuido aproximadamente en un 50% como calcio ionizado que es su forma biológicamente activa, 40% no ionizado, el cual se encuentra unido principalmente a albumina, y 10% formando complejos con diferentes iones. Por su parte el magnesio cuenta con un 55% ionizado, 30% unido a proteínas y 15% en complejo con iones y ácidos, mientras el fósforo está presente en el suero en forma de ácido fosfórico disociado ( $\text{H}_2\text{PO}_4$ ) en tres formas:  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  (Russell y Roussel, 2007).

La concentración de calcio se encuentra bajo estricto control endocrino, mediado por diferentes hormonas que regulan la absorción intestinal, la resorción o deposición ósea, la reabsorción renal, la excreción urinaria, el reciclaje salival, la deposición fetal en vacas preñadas, la secreción en leche y la excreción fecal de este mineral (Overton y Waldron, 2004). Entre las hormonas encargadas de la homeostasis de estos minerales se encuentran la hormona paratiroidea y la vitamina D 1,25-dihidroxitamina D, las cuales se encargan de la absorción intestinal, la reabsorción renal y la resorción ósea de calcio y fósforo. Además, la hormona paratiroidea se ha relacionado con la secreción de calcio, magnesio y fósforo en la leche, es decir que esta hormona participa en el flujo de minerales a la glándula mamaria (Overton y Waldron, 2004). Por otra parte, se encuentra la calcitonina, la cual es secretada por la glándula tiroides como respuesta a una alta concentración de calcio en suero (Goff, 2008). La calcitonina se encarga de la deposición mineral en el hueso, mientras aumenta su excreción urinaria (Overton y Waldron, 2004).

En vacas de producción de leche, el mantenimiento de estos minerales en sus concentraciones normales es de gran importancia debido principalmente a las funciones nerviosas y musculares que cumplen (Goff, 2006). En el posparto temprano la alteración en la concentración de estos minerales puede conllevar en casos extremos a que la vaca pierda la capacidad de ponerse en pie, y en casos menos graves generan reducción en el consumo de alimento, fallas en la función ruminal, problemas en la motilidad intestinal, baja productividad y mayor susceptibilidad a la presentación de enfermedades metabólicas o infecciosas (Goff, 2006).

Los minerales al ser clasificados como micronutrientes, han sido dejados a un lado en las estrategias de manejo nutricional del periodo de transición, sin tener en cuenta que estos compuestos participan en múltiples funciones en el organismo y que trastornos relacionados con su déficit, pueden generar diferentes problemas metabólicos que pueden afectar el nivel productivo y reproductivo de las vacas (Lean et al., 2013). Las funciones realizadas por los minerales solo pueden ser cumplidas cuando la cantidad suficiente de cada uno de estos compuestos es ingerida y metabolizada en las reacciones bioquímicas para mantener procesos como el crecimiento, el desarrollo, la producción y la reproducción. Además, se debe tener en cuenta que el equilibrio de estos minerales depende de su excreción, ya sea en productos, como es el caso de la leche, o por procesos fisiológicos normales (Suttle, 2010).

### **3.6 Análisis Sanguíneo: Hematocrito y Leucograma**

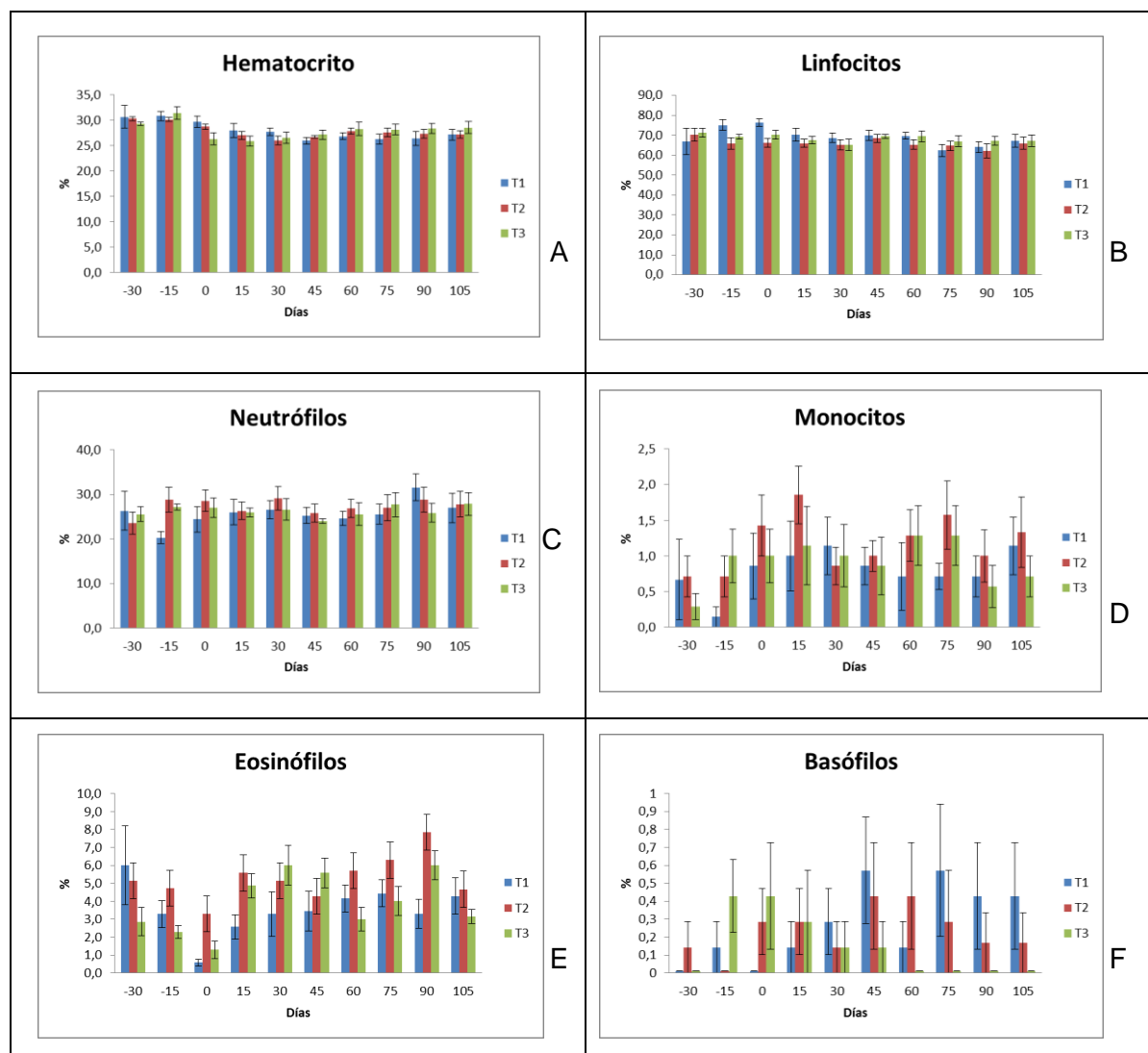
Los valores medios y la desviación estándar para cada el hemograma en los grupos experimentales y periodos evaluados se encuentran en el Anexo F.

El hematocrito presentó diferencias significativas entre el preparto y el posparto (tabla 8), con los valores más altos del experimento en los días -30 y -15 (Gráfica 6-A). Sin diferencias significativas los valores medios para los grupos fueron de  $27,97 \pm 1,82$ ;  $27,88 \pm 1,42$  y  $28,00 \pm 1,64$  %, para T1, T2 y T3, respectivamente. Se esperaba que los grupos suplementados presentaran diferencias frente al grupo control, lo cual no se observó.

Ruginosu et al. (2010) plantearon valores de referencia para hematocrito en bovinos de leche entre 24 y 46%, mientras Campos et al. (2007) determinan valores entre 22,8 y 28,6 % para vacas Holstein en condiciones de trópico. Rafia et al. (2012) encontraron un comportamiento similar al observado en el presente estudio con porcentajes elevados en los 30 días anteriores al parto (entre 30,31 y 31,39%) que disminuyen durante los primeros 30 días posparto (entre 25,60 y 28,01%).

El cambio que se presenta en el hematocrito, con una disminución en el porcentaje de eritrocitos puede estar explicado en el estrés que se presenta alrededor del parto con la

liberación de glucocorticoides desde la glándula adrenal que afectan el proceso de hematopoyesis (Nazifi et al., 2008). Por otra parte, el hematocrito también se ve afectado por la disminución en el catabolismo de proteínas durante el periodo de transición en vacas lecheras, debido a que los aminoácidos son destinados a la glándula mamaria para producción de leche y al hígado para ser incorporados al proceso de gluconeogénesis (Rafia et al., 2012).



**Gráfica 6. Porcentaje de eritrocitos y leucocitos en sangre. A Hematocrito, B. Linfocitos, C. Neutrófilos, D. Monocitos, E. Eosinófilos, F. Basófilos.**

El porcentaje de hematocrito corresponde a la fracción de volumen de la sangre ocupada por los eritrocitos (Ruginosu et al., 2010). Una adecuada oferta de materia seca de buena

calidad, principalmente relacionada con el aporte de proteína en la dieta favorece el proceso de hematopoyesis, reflejado en mayores porcentajes de hematocrito (Rafia et al., 2012).

La medición de hematocrito ha sido ampliamente usada para estimar si los animales presentan anemia, independiente de las alteraciones de tamaño o forma de los eritrocitos, es decir que con este procedimiento se puede apoyar el diagnóstico de esta patología mas no se puede identificar el tipo de anemia que se presenta (Rafia et al., 2012).

Para el porcentaje de linfocitos se presentaron diferencias significativas para los grupos (tabla 8), evidenciando el menor valor para T2 con  $65,99 \pm 2,16$  % en comparación con los otros dos grupos, donde T1 evidenció un valor de  $69,06 \pm 4,34$  y T3 de  $68,37 \pm 1,82$  %. Entre los periodos se encontró que el mayor porcentaje de estas células se presentó en los días -30, -15, seguidos del día del parto, para disminuir en el posparto (Gráfica 6-B).

Nozad et al. (2014) plantea valores entre 63,3 y 68,2% de linfocitos para vacas de alta producción de leche, mientras Dezfouli et al. (2011) encontró valores entre 62,42 y 65,98% para vacas Holstein sanas. Los porcentajes encontrados en el presente estudio son similares a los planteados por estos autores. El comportamiento observado en la concentración de linfocitos coincide con el hallado por Rafia et al. (2012) y Nozad et al. (2014), donde después del parto se presenta una disminución en el porcentaje de neutrófilos, lo cual puede explicarse por una disminución en la proliferación de estas células como consecuencia de todos los cambios endocrinos que se presentan alrededor del parto (Nazifi et al., 2008). Aunque se encontró el menor porcentaje de linfocitos en T2, estos valores se encuentran dentro del rango normal determinado para estas células y su menor porcentaje en comparación con los otros dos grupos podría explicarse en la respuesta individual de cada animal a las situaciones de estrés del posparto, donde algunas vacas pueden adaptarse más rápidamente a los cambios de este periodo y afectar en menor proporción la producción de este tipo de células (Nazifi et al., 2008).

Los linfocitos son predominantemente células B o células T, los linfocitos tipo B producen anticuerpos mientras que los linfocitos T participan en la regulación inmune y la inmunidad citotóxica (Jones y Allison, 2007). En bovinos, el estado de linfocitosis

patológica es inusual, y puede estar asociado con infecciones crónicas virales, condiciones piógeno-crónicas o enfermedades autoinmunes (Jones y Allison, 2007). Por otra parte, la linfopenia o insuficiente de linfocitos en sangre puede ser causa por situaciones de estrés en el animal o administración exógena de corticosteroides (Nazifi et al., 2008), o en casos más relevantes por infecciones virales o bacterianas agudas, endotoxemia o inmunodeficiencias no comunes (Jones y Allison, 2007).

En el presente estudio los neutrófilos no se vieron afectados significativamente por el efecto grupo o por el periodo (Tabla 8). Los valores medios hallados fueron de  $25,76 \pm 2,78$  para T1,  $27,28 \pm 1,74$  para T2 y  $26,33 \pm 1,17$  % para T3, que corresponden a animales sin desafíos patológicos. Pal y Bhatta (2013) determinan como rango de referencia para estas células porcentajes entre 25 y 40%. Dezfouli et al. (2011) encontraron para vacas Holstein sanas valores entre 31,62 y 36,78%. Pal y Bhatta (2013) hallaron valores entre 29,81 y 32,59, también para vacas de producción de leche. Nozad et al. (2014) evidencio valores de 29,4% en la lactancia temprana, mientras en la lactancia media y tardía obtuvieron valores de 33,4 y 31,6%, respectivamente. Los valores encontrados en el presente estudio coincidieron con los hallados por los anteriores autores encontrándose dentro del rango de referencia (Gráfica 6-C).

Los neutrófilos son glóbulos blancos que migran rápidamente hacia los tejidos en riesgo de infección para intentar combatir bacterias o agentes extraños por medio del proceso de fagocitosis (Rafia et al., 2012). La neutrofilia ocurre principalmente como respuesta a procesos infecciosos, lesión de los tejidos, enfermedades neoplásicas o enfermedades inflamatorias. Esta situación puede presentarse también como respuesta fisiológica a altos niveles de estrés (Jones y Allison, 2007). Contrariamente, la neutropenia o insuficiencia de neutrófilos puede ser causada por enfermedades inflamatorias agudas, incluyendo sepsis gram-negativa, metritis, mastitis, peritonitis, neumonía, o infección por salmonella, entre otras. Otro factor que puede ser causante de neutropenia es la presentación de lesiones en la medula ósea causadas por intoxicación con helecho macho (Jones y Allison, 2007).

El porcentaje de monocitos no se vio afectado ni por los tratamientos ni por el periodo experimental (tabla 8). Los valores medios para estas células fueron de 0,80; 1,18; y 0,91% para T1, T2 y T3 respectivamente (Gráfica 6-D). Pal y Bhatta (2013) muestra

valores de referencia entre 2 y 4% para estas células. Nazifi et al. (2008), encontraron una amplia variación en los porcentajes de estas células durante el posparto temprano, con valores alrededor de 0,24 y 6,36% a los 30 días posparto. Ruginosu et al. (2010) también encontró valores por debajo del rango de referencia para los monocitos.

Los monocitos son células blancas que participan en la respuesta inmune ingresando a los tejidos desde la circulación para convertirse en macrófagos que fagocitan organismos o partículas infecciosas además de desechos celulares (Jones y Allison, 2007). El porcentaje de estas células es muy variable en bovinos y por tanto no se considera un buen indicador de procesos patológicos. Sin embargo, aumento en el porcentaje de estas células puede acompañar situaciones de inflamación crónica, necrosis de tejidos, hemolisis o estrés, mientras un bajo nivel de monocitos se asocia con endotoxemia o viremia (Jones y Allison, 2007). En el presente trabajo no se encontraron procesos patológicos en las vacas, y por tanto se descarta la posibilidad de que los animales estuvieran bajo alguno de los trastornos mencionados anteriormente.

Los eosinófilos presentaron diferencias significativas entre grupos (tabla 8), presentando el valor medio más alto en el T2 con  $5,26 \pm 1,40$  %, mientras para T1 fue de  $3,53 \pm 1,22$  % y para T3 de  $3,90 \pm 1,65$  %. Entre los periodos el menor porcentaje se evidenció en el día del parto, mientras el mayor valor se encontró en el día 90 posparto (Gráfica 6-E). Ruginosu et al. (2010) indican valores de referencia entre 2 a 10% para los eosinófilos. Los valores hallados en el presente trabajo se encuentran dentro del anterior rango de referencia y coinciden con resultados hallados por Rafia et al. (2011) donde estos autores evidenciaron una clara disminución de los eosinófilos en el periodo alrededor del parto.

No se encontró una explicación fisiológica donde se relacione la suplementación yodada con la proliferación de eosinófilos, por tanto, las diferencias estadísticas encontradas podrían no ser atribuidas directamente al tratamiento sino a la alta variación que se presenta en el conteo de estas células por su baja concentración en sangre. La disminución en el porcentaje de eosinófilos al momento del parto ha sido asociada a los cambios metabólicos y endocrinos que se presentan durante el puerperio (Rafia et al., 2012).

Los eosinófilos participan en la función inmune principalmente sobre parásitos, alérgenos y procesos inflamatorios. Estas células cuentan con proteínas granulares que son

citotóxicas para diferentes agentes patógenos como helmintos, protozoos, hongos y bacterias (Jones y Allison, 2007). La eosinofilia puede presentarse en casos parasitarios, o donde se presente neumonía intersticial atípica, enfisema pulmonar agudo, o por la formación de anticuerpos en leche, mientras que la eosinopenia es difícil de encontrar en bovinos debido a que en los conteos celulares es aceptable hasta un rango de cero por ciento. Sin embargo, se puede presentar en casos de procesos inflamatorios agudos o como respuesta a situaciones de estrés (Jones y Allison, 2007).

Sin diferencias significativas entre grupos para basófilos (tabla 8), los valores medios hallados fueron de  $0,27 \pm 0,21$ ;  $0,23 \pm 0,13$  y  $0,14 \pm 0,17$  % para T1, T2 y T3 respectivamente (Gráfica 6-F), encontrándose dentro del rango de referencia para estas células, el cual se encuentra entre 0 y 4% (Ruginosu et al., 2010) y coincidiendo con valores hallados por Pal y Bhatta (2013).

Los basófilos se encuentran en pequeñas cantidades en los rumiantes, y por tanto su ausencia en los recuentos diferenciales manuales es considerada normal. Sin embargo, su porcentaje en sangre puede aumentar en casos de dermatosis alérgica o reacciones de hipersensibilidad (Jones y Allison, 2007). Los basófilos participan en procesos inflamatorios y alérgicos por medio de la liberación de mediadores inflamatorios como histamina y heparina en las reacciones de hipersensibilidad inmediata (Jones y Allison, 2007).

**Tabla 8. Significancia estadística asociada a bioquímica sanguínea.**

Variable	Modelo	Grupo	Periodo	Grupo*Periodo
Hematocrito	<0,0001	0,9577	<0,0001	0,3045
Linfocitos	0,0461	0,0237	0,0271	0,6047
Neutrófilos	<0,0001	0,3590	0,6509	0,8044
Monocitos	0,0644	0,0801	0,2855	0,9303
Eosinófilos	<0,0001	0,0002	0,0002	0,1600
Basófilos	0,7436	0,3536	0,8988	0,5285

Cuando  $p < 0,05$  se considera que existen diferencias estadísticas.

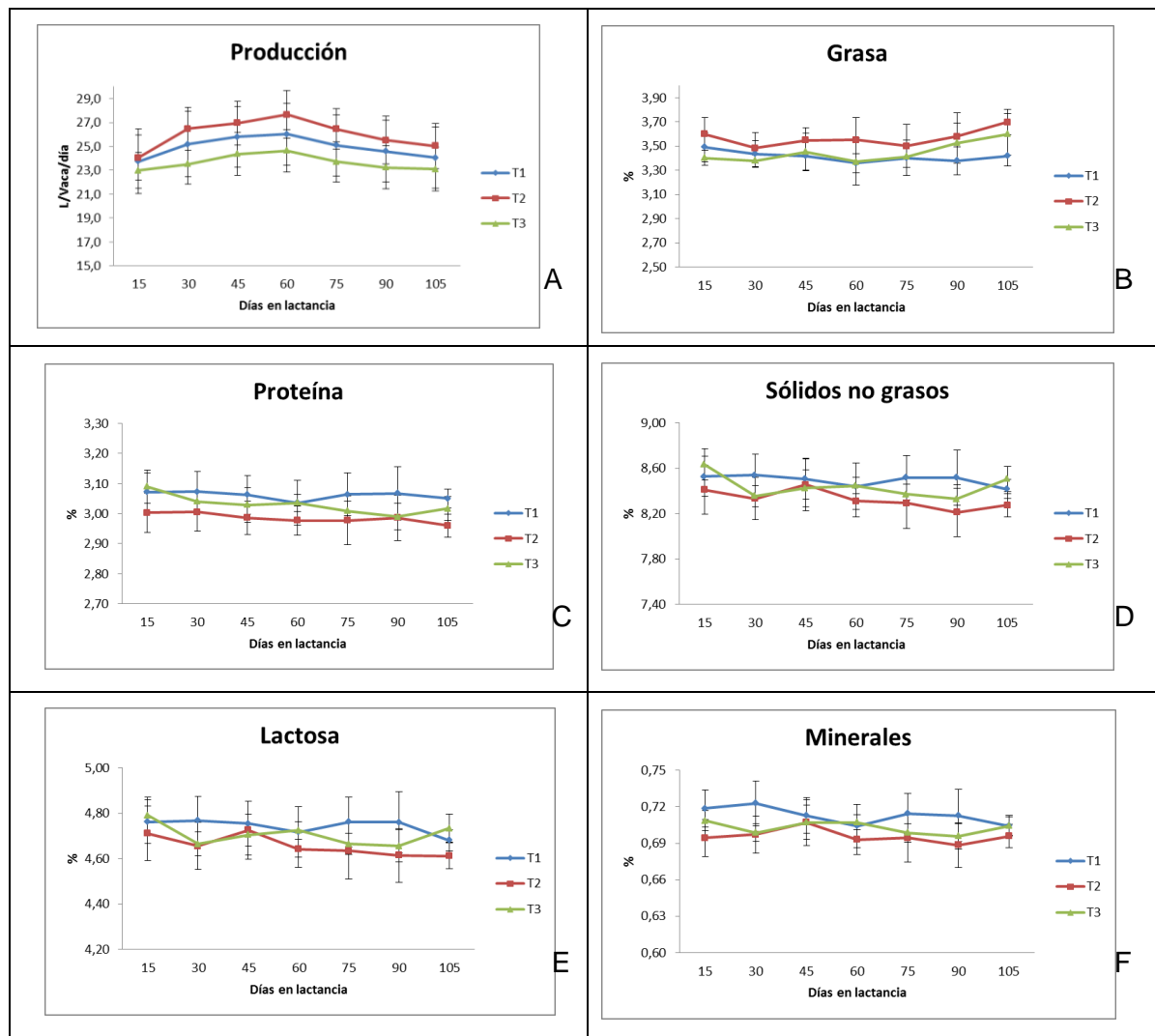


La evaluación hematológica es una importante herramienta paraclínica de diagnóstico, que permite obtener información sobre la respuesta inmune de los animales y facilita el pronóstico de determinadas la enfermedad (Rafia et al., 2012). Diferentes factores tanto intrínsecos como extrínsecos pueden afectar los parámetros hematológicos (Nazifi et al., 2008). Este tipo de evaluaciones también permite entender la relación entre características de la sangre, el estado de los tejidos y el medio ambiente que rodea los animales (Rafia et al., 2012). En el periodo de transición se presentan notables cambios en la concentración de glóbulos rojos y blancos, indicando que la alteración en el estado nutricional y hormonal de los animales altera la proliferación y la funcionalidad de las células sanguíneas (Rafia et al., 2012).

### **3.7 Producción y Composición de Leche**

Los valores medios y la desviación estándar para producción y composición de leche en los grupos experimentales y periodos evaluados se encuentran en el Anexo F. En producción de leche se encontró el valor más alto en el día 60 posparto, seguido del día 45, mientras la menor producción se presentó en los días 15 y 105 (Gráfica 7-A). Según este resultado se puede determinar que el pico de lactancia en las vacas del experimento se dio en el día 60, difiriendo de datos informados para ganado Holstein en Colombia, donde la mayor producción de leche se da alrededor del día 44 posparto (Cañas et al., 2012). El momento donde las vacas alcanzan la mayor producción de leche está influenciado por diferentes factores asociados al animal y al ambiente en el que se encuentra (Cañas et al., 2012).

Entre los factores directamente asociados al animal se encuentran el número de partos, la edad de la vaca y la composición genética del animal, aunque el principal factor que afecta el pico de lactancia es la época de parto, donde animales que tienen sus crías en épocas lluviosas alcanzan una mayor producción de leche en menor tiempo que animales que paren en época seca (Calvache y Navas, 2012).



**Figura 7. Producción y porcentajes de componentes en leche. A. Producción (L/vaca/día), B. Grasa, C. Proteína, D. Sólidos no grasos, E. Lactosa, F. Minerales.**

Los factores climáticos influyen directamente el rendimiento en leche, debido a que estos afectan la producción y composición de forraje, determinando la cantidad y calidad de nutrientes que van a obtener las vacas durante el pastoreo. Además, las condiciones ambientales también pueden afectar el consumo voluntario de alimento que ya se encuentra disminuido durante el posparto temprano (Calvache y Navas, 2012).

**Tabla 9. Significancia estadística asociada a producción y composición de leche**

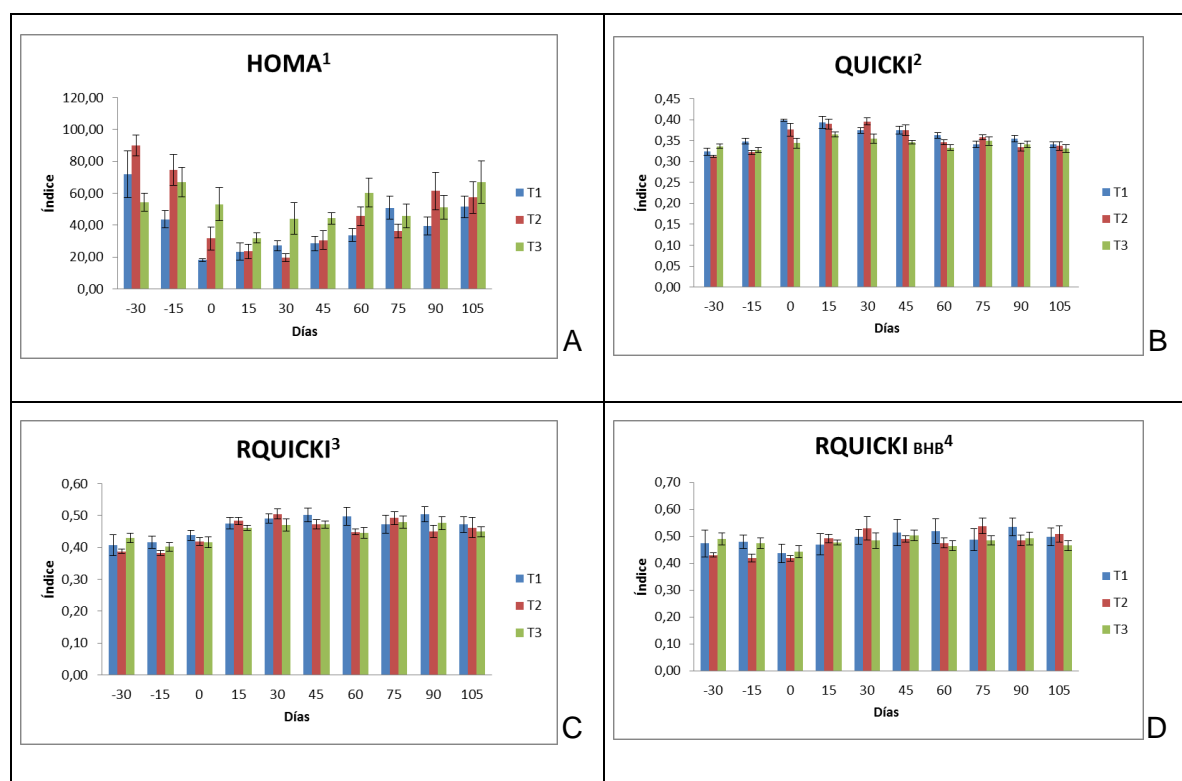
<b>Variable</b>	<b>Modelo</b>	<b>Grupo</b>	<b>Periodo</b>	<b>Grupo*Periodo</b>
Producción	<0,0001	0,7590	<0,0001	0,0974
Grasa	<0,0001	0,1517	0,1471	0,7922
Proteína	<0,0001	0,3150	0,0671	0,7891
Sólidos no grasos	<0,0001	0,4142	0,7523	0,8230
Lactosa	<0,0001	0,1817	0,7445	0,7302
Minerales	<0,0001	0,8683	0,6377	0,9215

Cuando  $p < 0,05$  se considera que existen diferencias estadísticas.

En el caso del presente trabajo las condiciones ambientales pueden estar retrasando la llegada al pico de producción. Factores como la edad o número de partos de los animales no serían tan relevantes debido a que en el experimento se encontraban animales con diferente edad y diferente número de lactancias y en los tres grupos experimentales se observa la misma tendencia en producción de leche.

En la Gráfica 7 se presenta el comportamiento de los componentes de la leche durante el experimento. La composición de leche no se vio afectada por la suplementación dada a los animales (tabla 9), lo cual era un resultado esperado debido a que no se modificó la base alimenticia de los animales (pastoreo y suplementación al ordeño), y por tanto no se intervino en el metabolismo ruminal, ni se afectó directamente el aporte de sustratos a la glándula mamaria para síntesis de leche.

### 3.8 Índices de Resistencia Insulínica



**Gráfica 8. Índices de sensibilidad insulínica. A. <sup>1</sup>Homeostasis Model Assessment (HOMA), B. <sup>2</sup>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI), C. <sup>3</sup>Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (RQUICKI), D. <sup>4</sup>Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index Beta-hidroxibutirato (RQUICKI BHB).**

Los valores medios y la desviación estándar para cada uno de los índices en los grupos experimentales y periodos evaluados se encuentran en el Anexo H.

Entre las diferentes técnicas que se han implementado para evaluar la sensibilidad de los tejidos a la insulina, las más nombradas han sido el clamp euglucémico hiperinsulinémico, el clamp hiperglucémico y la prueba de tolerancia a la glucosa, sin embargo son pruebas altamente invasivas que requieren el manejo de estrictos protocolos para su desarrollo. Por tanto, se han buscado técnicas menos invasivas que permitan estimar la sensibilidad a la insulina de una forma práctica y a la vez confiable, de esta forma se ha generado el uso de índices obtenidos a través de fórmulas

matemáticas utilizando concentraciones sanguíneas de insulina, glucosa, NEFA y BHB (Keskin et al., 2005).

Se debe tener en cuenta que estos modelos o índices de estimación se han desarrollado originalmente para su uso en medicina humana y posteriormente se han adoptado en el área de medicina veterinaria y producción animal, siendo ampliamente aplicados ya que solo se requiere de una muestra sanguínea por medio de la cual se puede obtener toda la información requerida para su cálculo y análisis (Koster y Opsomer, 2013). Entre los índices propuestos se encuentran el HOMA y el QUICKI, los cuales son los primeros modelos usados para la estimación de sensibilidad insulínica (Kusenda, 2010).

En el modelo HOMA se emplean las concentraciones sanguíneas de insulina y glucosa divididas por una constante la cual proviene del producto de la concentración normal tanto de glucosa como de insulina que deberían tener las personas sanas en condiciones de ayuno (Muniyappa et al., 2008). Diferentes estudios realizados en vacas de producción de leche han adaptado este modelo, realizando solo el producto de las concentraciones de insulina y glucosa sin tener en cuenta la constante (Abuelo et al., 2014; Kusenda, 2010), adaptación que fue aplicada en el presente trabajo. En medicina valores altos de HOMA son característicos en sujetos con una alta concentración de insulina sérica y se consideran pacientes resistentes a la insulina (Muniyappa et al., 2008).

En el modelo QUICKI el índice se deriva del cálculo de la inversa de la suma de los logaritmos de la concentración sanguínea de insulina y de glucosa, y contrariamente al modelo HOMA, en el índice QUICKI al disminuir la concentración de insulina, el valor de éste aumenta, indicando una menor resistencia a la insulina en los tejidos periféricos (Gellrich, 2012). Los siguientes dos modelos usados frecuentemente son el RQUICKI y el RQUICKI BHB, los cuales son modificaciones realizadas al QUICKI, incorporando la concentración sanguínea de NEFA en el RQUICKI y de NEFA y BHB en el RQUICKI BHB con lo cual se ha obtenido una mejor correlación con las pruebas especializadas (Kusenda, 2010).

En resumen, valores más elevados de HOMA serán indicadores de mayor resistencia insulínica, mientras que, por el contrario, mayores valores de QUICKI, RQUICKI y RQUICKI BHB serán indicadores de una menor resistencia insulínica (Koster y Opsomer,

2013). Otro índice usado en la evaluación de resistencia insulínica en humanos es la relación Glucosa/Insulina, sin embargo ha tenido bajo peso diagnóstico debido a que no refleja adecuadamente la fisiología en los determinantes de sensibilidad a la insulina (Muniyappa et al., 2008).

Dentro de la revisión de literatura realizada no se encontraron puntos críticos para cada uno de los modelos de estimación de sensibilidad insulínica, indicando que hasta el momento no se han definido valores que permitan determinar cuál es el punto de corte entre vacas sanas y vacas que presentan resistencia a la insulina. Su uso se ha aplicado ampliamente en trabajos donde se realizan comparaciones entre grupos experimentales sometidos a diferentes tratamientos con modificaciones en la dieta (Keskin et al., 2005).

En el presente estudio se encontró para el modelo HOMA el mismo comportamiento hallado en la concentración de insulina, el mayor índice fue encontrado en T3 ( $51,99 \pm 11,04$ ), seguido de T2 ( $47,06 \pm 23,19$ ) y T1 ( $38,40 \pm 16,21$ ), al igual que la mayor concentración de la hormona fue para T3, seguido de T2 y por ultimo T1; lo cual se explica por la participación directa de la insulina en la fórmula matemática para este índice. En este modelo se encontraron los mayores valores en el periodo preparto (día -30 y -15) y al final de experimento en el día 105. Mientras los menores valores se hallaron entre los días 0 y 45 posparto (Gráfica 8-A), comportamiento que coincide con el hallado por Abuelo et al. (2014), quien plantea valores del índice HOMA de 63,38 entre los días 29 a 3 antes del parto, 39,87 para los días 3 a 30 posparto y 69,51 desde el día 31 al 90 posparto, mientras Haarstrich (2011) encontró valores de  $31,1 \pm 14,9$  a los 180 días en lactancia. Muniyappa et al. (2008) afirma que a partir del modelo HOMA no se puede definir la funcionalidad de las células  $\beta$  y por tanto no es un estimativo confiable en el diagnóstico de resistencia insulínica.

Por otra parte el modelo QUICKI evidenció un comportamiento similar entre los tres grupos con valores medios de  $0,34 \pm 0,02$ ;  $0,35 \pm 0,03$ ; y  $0,36 \pm 0,01$  para T1, T2 y T3 respectivamente. La similitud encontrada entre los tratamientos se explica por la transformación logarítmica que agrupa los datos en cada uno. Entre los periodos presentó los valores más bajos en el periodo preparto (día -30 y -15) y al final del experimento en los días 90 y 105 posparto (Gráfica 8-B), con los mayores valores entre el día 0 y el 45 posparto. Los valores encontrados coinciden con Abuelo et al. (2014)

quienes informan valores en el preparto de 0,33; en el inicio de la lactancia de 0,36 y para el pico de producción de 0,33; mientras Gellrich (2012) halló valores entre 0,32 y 0,52 para vacas en periodo de transición, sin que se puede precisar si hay o no resistencia insulínica por la ausencia de valores de corte indicativos de la misma.

Los valores encontrados en los modelos HOMA y QUICKI evidencian un comportamiento asociada a los valores de insulina. Se puede observar que en los periodos donde se presentó una mayor concentración de insulina también se obtuvo un elevado índice HOMA. Por el contrario, en los periodos donde se evidenciaron valores elevados de la hormona se obtuvieron los menores índices para el modelo QUICKI. Con lo cual se puede deducir que para el presente trabajo el valor de estos índices esta modulado principalmente por la concentración de esta hormona, con una relación directamente proporcional entre insulina y HOMA, e inversamente proporcional entre insulina y QUICKI, coincidiendo con el planteamiento realizado por Muniyappa et al. (2008).

Para el caso del modelo RQUICKI se encontraron los valores más bajos en el periodo preparto y al inicio de la lactancia (Gráfica 8-C), evidenciando un incremento en el índice después del día 15 que se mantuvo relativamente constante hasta el final del experimento. Los valores medios para cada grupo fueron de  $0,47 \pm 0,04$  para T1,  $0,45 \pm 0,04$  en T2 y  $0,45 \pm 0,03$  para T3.

Holtenius y Holtenius (2007) hallaron valores similares de este índice, con 0.48 en las primeras 3 semanas posparto, para mantenerse entre la semana 4 y la 15 entre 0,50 y 0,52; por su parte Gross et al. (2011) plantean que 3 semanas antes del parto el índice RQUICKI comienza a descender para presentar el valor más bajo en la semana dos posparto e incrementar gradualmente a partir de ese momento, los resultados del presente trabajo coinciden con los indicados por estos autores.

El RQUICKI BHB evidenció los menores valores en los primeros cuatro periodos experimentales, es decir desde el día -30 preparto hasta el día 15 posparto (Gráfica 8-D), con el menor valor en el día del parto. A partir de los 30 días posparto los valores aumentaron manteniéndose constantes hasta el final del experimento. Los valores medios para este índice fueron de  $0,49 \pm 0,03$ ;  $0,48 \pm 0,04$  y  $0,48 \pm 0,02$  para T1, T2 y T3, respectivamente. Abuelo et al. (2014) encontraron un comportamiento similar con valores de 0,46 antes del parto y 0,53 en el posparto temprano, mientras Balogh et al.

2008 encontraron que entre los días 10 a 15 posparto se presentaron menores valores para el RQUICKI BHB, y Haarstrich (2011) evidenció valores entre 0,50 y 1,36 en la etapa media de la lactancia.

Tanto el RQUICKI como el RQUICKI BHB presentaron un comportamiento similar, con menores valores en el preparto, parto y el inicio de la lactancia, lo cual estaría indicando una menor sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina en esta etapa, con la finalidad de favorecer la absorción de nutrientes por la glándula mamaria y por tanto, los valores de estos índices podrían estar directamente asociados al nivel productivo de los animales, donde vacas lecheras de alto rendimiento presentaran mayor resistencia insulínica con menores valores de RQUICKI, en comparación con vacas de menor producción de leche que evidenciarían valores de RQUICKI superiores (Gross et al., 2011). El efecto de la etapa fisiológica en la que se encuentran los animales sobre el valor del RQUICKI indica que este índice se afecta considerablemente por los cambios metabólicos y hormonales que ocurren en el organismo alrededor del parto, asociados a la lipomovilización (NEFA) y al balance energético negativo. Los resultados muestran que tiene un bajo poder de discriminación en el diagnóstico de resistencia insulínica como patología clínica (Kerestes et al., 2009). Kerestes et al. (2009) plantea que son necesarios estudios donde se evalúe el RQUICKI en vacas con diferentes niveles de producción y condiciones nutricionales, además de que se deben realizar comparaciones entre animales sanos y animales con diferentes alteraciones metabólicas, para así validar este índice en el diagnóstico de resistencia insulínica.

Los mayores valores encontrados en los índices correspondientes a los grupos suplementados (T2 y T3) pueden estar explicados en la mayor concentración de insulina que se presentó en éstos, posiblemente en respuesta a una mayor concentración de hormonas tiroideas como fue explicado en el análisis individual de esta hormona.

En los índices correspondientes al RQUICKI y RQUICKI BHB se encuentran resultados similares en los grupos suplementados; estos dos índices incluyen los indicadores metabólicos NEFA y BHB, los cuales presentaron los menores valores en estos grupos en comparación con el grupo control. En el presente trabajo se consideran los índices como una posibilidad de analizar la resistencia insulínica, al no encontrarse puntos de



corte que pudieran determinar si esta existe o no, no se realizaron correlaciones con la producción de leche ni con la posible presentación de cetosis subclínica y clínica.

Las relaciones estadísticas realizadas entre los modelos evaluados determinaron que HOMA se correlacionó negativamente con QUICKI ( $r = -0,92$ ;  $p < 0,0001$ ), RQUICKI ( $r = -0,61$ ;  $p < 0,0001$ ) y RQUICKI BHB ( $r = -0,34$ ;  $p < 0,0001$ ). QUICKI evidenció correlación positiva con RQUICKI ( $r = 0,54$ ;  $p < 0,0001$ ) y con RQUICKI BHB ( $r = 0,21$ ;  $p < 0,0026$ ), mientras RQUICKI y RQUICKI BHB se correlacionaron positivamente ( $r = 0,80$ ;  $p < 0,0001$ ). La correlación negativa encontrada entre HOMA y los índices QUICKI se explica en la forma matemática de la obtención de estos valores, mientras en HOMA se genera una relación directa con la concentración de insulina y glucosa, en los índices QUICKI, RQUICKI y RQUICKI BHB se genera una relación inversa con la transformación matemática derivada de las concentraciones de glucosa, insulina, y adicionalmente NEFA y BHB (Muniyappa et al., 2008).

Las asociaciones encontradas entre QUICKI, RQUICKI y RQUICKI BHB, han sido encontradas también por otros autores (Balogh et al., 2008; Abuelo et al., 2014). Los coeficientes de correlación encontrados entre los índices QUICKI y sus derivados muestran la alta asociación que se presenta entre el RQUICKI y el RQUICKI BHB, evidenciando que las concentraciones de glucosa, insulina y NEFA serían suficientes para obtener el índice, y la inclusión de la concentración de BHB no causaría un mayor impacto en los resultados. Así mismo, se observa una importante asociación entre QUICKI y RQUICKI, mientras entre QUICKI y RQUICKI BHB es menor, por tanto se confirmaría que en caso de elección el RQUICKI sería el índice que mejor representaría los resultados de estos tres modelos.

Aunque el uso de los índices de estimación de sensibilidad insulínica se ha extendido en el área de medicina veterinaria, la aplicabilidad de estos en producción animal requiere mayor investigación (Haarstrich, 2011). Uno de los principales problemas asociados al uso de estos índices es que en humanos es obligatorio que se encuentren en condiciones de ayuno durante la noche para la toma de muestras en la mañana siguiente, pero en condiciones reales de producción bovina no es factible tener los animales en este estado, pues así no hayan consumido alimento durante un determinado número de horas, el gran contenido ruminal, que representa un depósito de nutrientes de larga duración y el mayor porcentaje de reservas grasas en estos animales, no permiten

inducir la misma situación metabólica que genera el ayuno de la noche en los seres humanos (Kusenda, 2010; Haarstrich, 2011). Sumado a esto, debe considerarse que la concentración de glucosa, insulina, NEFA y BHB en vacas lecheras cambia significativamente al final de la preñez y durante la lactancia temprana como un proceso de adaptación al nuevo estado fisiológico, por tanto durante esta etapa se reduce la validez en el uso de estos índices y debe considerarse si es adecuado o no su uso para caracterizar la sensibilidad insulínica (Koster y Opsomer, 2013). Otro factor a tener en cuenta en la aplicación de los índices, es que algunas situaciones de estrés durante el muestreo pueden generar cambios en la concentración de glucosa, insulina y NEFA (Gross et al., 2011).

Finalmente, otros factores no asociados al animal pueden influir en la aplicación de los índices, así por ejemplo, las diferentes técnicas de laboratorio usadas para la medición de las concentraciones sanguíneas de los metabolitos y en especial la precisión y sensibilidad para la determinación de insulina (Koster y Opsomer, 2013).

## **4. Conclusiones y recomendaciones**

### **4.1 Conclusiones**

Se presentan indicadores metabólicos y hormonales que permiten estudiar la movilización lipídica, el balance energético y la homeostasis en el periodo de transición en vacas lecheras en condiciones de trópico bajo.

La suplementación mineral y vitamínica mostró efecto significativo en la concentración de glucosa, insulina, albumina, globulinas, fósforo y ALT.

Se calcularon indicadores para resistencia insulínica, los valores obtenidos constituyen un punto de partida en las condiciones experimentales para la caracterización de esta limitante metabólica aun no dilucidada completamente en vacas lecheras.

La incidencia de cetosis subclínica, tomada como el porcentaje de animales que por lo menos en uno de los periodos experimentales presentó valores de BHB > 1,00 mmol/L, fue de 71,4% para T1, 57,1% para T2 y 71,4% para T3, sin embargo, el porcentaje de animales con BHB > 1,40 mmol/L fue de 42,9% en T1, de 28,6% en T2 y 9% en T3.

La relación encontrada entre los metabolitos sanguíneos indicadores de movilización lipídica BHB y NEFA, con la concentración de cetonas determinadas con tiras reactivas de orina permite sugerir este método como una forma de identificación rápida de cetosis subclínica, lo cual sería de gran utilidad para los productores, por su capacidad diagnóstica de bajo costo.

## 4.2 Recomendaciones

Los resultados del presente trabajo reafirman la importancia del periodo de transición, evidenciando diferentes cambios metabólicos y endocrinos que se presentan al inicio de la lactancia, por tal razón, se deben seguir realizando estudios que brinden alternativas para el manejo de este periodo, donde no solo se involucre suplementación energética, sino que también se tenga en cuenta otros nutrientes de vital importancia en diversos procesos bioquímicos que podrían verse severamente afectados en este periodo como consecuencia del aumento en los requerimientos nutricionales y el bajo consumo de alimento.

Las vitaminas y minerales, a pesar de sus requerimientos mínimos deben ser considerados como estratégicos para la homeostasis, la producción de leche y la salud animal.

La aplicación de índices para estimación de resistencia insulínica debe ser replanteada en base a las diferencias que existen entre la fisiología humana y animal, en especial para vacas lecheras cuyos desafíos nutricionales y productivos afectan las concentraciones basales de hormonas y metabolitos que podrían afectar la validez de los indicadores.

Se deben continuar desarrollando estudios que permitan ampliar el conocimiento sobre los procesos involucrados en el metabolismo y homeostasis de las vacas de alta producción de leche durante el periodo de transición, con la finalidad de optimizar el manejo nutricional de los animales y asegurar el éxito de la lactancia.

Se recomienda el diagnóstico de cetosis subclínica por métodos seguros y confiables, porque la incidencia de esta patología parece ser más elevada que lo que la literatura consultada evidencia.

## **Anexos: Tablas con las variables analizadas durante el estudio**

**Anexo A. Metabolitos energéticos para cada uno de los periodos y los grupos. El día -30 y -15 corresponden a periodos preparto y el Día 0 al parto. DE= Desviación estándar.**

PERIODO	GRUPO	METABOLITOS ENERGETICOS Y CONDICION CORPORAL									
		Glucosa (mmol/L)		BHB (mmol/L)		NEFA (mmol/L)		Cetonas (mmol/L)		CC (Puntos)	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Día -30	T1	3,60	0,31	0,51	0,21	0,27	0,12	0,16	0,28	3,58	0,14
	T2	3,73	0,98	0,56	0,14	0,24	0,02	0,00	0,00	3,61	0,13
	T3	2,83	0,34	0,54	0,16	0,24	0,09	0,07	0,19	3,64	0,13
Día -15	T1	3,79	0,47	0,50	0,17	0,40	0,18	0,07	0,19	3,63	0,14
	T2	3,24	0,54	0,62	0,19	0,34	0,12	0,00	0,00	3,61	0,13
	T3	2,96	0,19	0,44	0,12	0,29	0,09	0,07	0,19	3,64	0,13
Día 0	T1	2,39	0,40	1,44	0,93	0,68	0,33	2,49	5,08	3,00	0,29
	T2	2,02	0,51	1,09	0,46	0,56	0,22	2,24	3,08	3,07	0,24
	T3	2,80	0,40	0,74	0,13	0,34	0,13	0,07	0,19	3,25	0,32
Día 15	T1	2,43	0,59	1,65	1,22	0,50	0,41	6,85	6,92	2,93	0,19
	T2	2,12	0,49	1,04	0,57	0,33	0,10	2,45	2,95	2,96	0,17
	T3	2,54	0,42	0,86	0,14	0,27	0,07	0,49	0,49	3,04	0,47
Día 30	T1	2,85	0,36	1,14	0,82	0,26	0,11	4,20	5,80	2,96	0,22
	T2	1,90	0,31	1,23	0,98	0,35	0,27	2,00	2,88	2,93	0,12
	T3	2,39	0,34	0,94	0,29	0,22	0,08	0,42	0,52	3,11	0,32
Día 45	T1	2,85	1,44	1,30	0,89	0,24	0,13	3,71	5,97	2,96	0,34
	T2	2,39	0,58	0,86	0,26	0,29	0,09	1,26	1,26	2,96	0,17
	T3	2,63	0,79	0,76	0,19	0,17	0,03	0,77	1,41	3,04	0,34
Día 60	T1	2,72	0,24	1,04	0,55	0,22	0,12	1,45	2,19	3,00	0,20
	T2	2,39	0,49	0,82	0,30	0,22	0,05	0,49	0,69	2,96	0,17
	T3	2,31	0,35	0,84	0,24	0,19	0,09	0,70	1,44	3,00	0,35
Día 75	T1	2,95	0,38	1,00	0,42	0,19	0,11	0,77	0,68	3,00	0,20
	T2	2,34	0,42	0,72	0,23	0,19	0,05	0,56	0,65	2,96	0,17
	T3	2,67	0,32	0,95	0,22	0,17	0,03	0,42	0,52	2,96	0,22
Día 90	T1	2,58	0,54	0,85	0,34	0,17	0,09	0,35	0,54	3,04	0,27
	T2	2,57	0,38	0,69	0,15	0,18	0,02	0,81	0,73	2,83	0,13
	T3	2,51	0,47	0,89	0,22	0,16	0,03	0,21	0,26	3,00	0,29
Día 105	T1	3,09	0,88	0,85	0,33	0,19	0,12	0,42	0,52	3,11	0,28
	T2	2,43	0,38	0,63	0,13	0,18	0,08	0,14	0,22	3,00	0,16
	T3	2,98	0,60	0,88	0,28	0,17	0,04	0,35	0,24	2,96	0,22

**Anexo B. Metabolitos proteicos para cada uno de los periodos y los grupos. El día -30 y -15 corresponden a periodos preparto y el Día 0 al parto. DE= Desviación estándar.**

PERIODO	GRUPO	METABOLITOS PROTEICOS							
		Proteína (g/L)		Albumina (g/L)		Globulina (g/L)		Urea (mmol/L)	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Día -30	T1	81,13	12,69	27,81	0,92	53,32	13,46	5,51	0,67
	T2	74,90	7,48	30,59	2,46	44,93	7,62	4,98	0,72
	T3	74,47	4,51	27,31	0,90	47,25	5,02	5,55	1,22
Día -15	T1	73,68	7,79	26,29	1,80	44,50	8,41	5,82	0,73
	T2	72,07	7,22	26,63	2,25	43,89	9,97	5,03	0,45
	T3	71,97	7,58	26,09	3,54	45,88	7,13	5,68	1,68
Día 0	T1	73,07	4,99	26,13	1,48	46,28	6,17	5,82	0,85
	T2	63,89	2,90	29,07	2,02	34,02	5,09	4,77	0,35
	T3	66,27	5,11	24,86	3,41	40,22	3,04	6,05	1,59
Día 15	T1	74,09	4,24	24,82	2,36	50,60	9,46	5,29	1,02
	T2	70,17	5,44	28,47	2,46	41,70	5,93	5,41	0,66
	T3	72,59	4,16	25,63	3,82	48,53	5,47	5,59	1,25
Día 30	T1	75,73	5,61	26,30	2,91	49,43	6,26	5,49	1,23
	T2	70,14	4,21	27,50	1,77	41,92	5,66	5,74	0,59
	T3	73,19	5,91	25,77	2,30	46,54	5,79	5,68	1,14
Día 45	T1	74,79	5,16	24,70	0,44	50,11	5,50	6,20	1,64
	T2	70,09	3,59	27,45	0,55	44,70	9,52	5,14	0,51
	T3	70,06	2,84	27,54	1,09	43,74	5,23	6,03	1,43
Día 60	T1	75,49	4,30	27,66	2,05	47,68	7,02	6,21	0,72
	T2	75,64	5,88	29,04	0,80	45,42	7,29	5,80	0,84
	T3	72,76	3,90	25,90	1,18	46,44	4,17	6,01	1,24
Día 75	T1	72,44	2,44	24,83	1,23	47,32	4,46	6,99	0,78
	T2	69,94	3,64	28,29	2,15	41,65	4,88	5,56	0,57
	T3	72,01	5,14	27,85	1,09	44,53	5,23	6,01	0,87
Día 90	T1	73,73	4,42	26,28	1,61	47,05	5,74	6,19	1,36
	T2	75,42	5,64	28,43	1,25	46,99	5,40	5,16	0,83
	T3	70,03	2,35	27,72	1,04	42,55	3,76	6,24	1,27
Día 105	T1	74,79	2,44	27,27	2,75	50,28	7,94	6,62	1,09
	T2	71,28	3,86	28,22	0,73	43,78	5,38	4,87	0,60
	T3	72,79	5,81	28,24	0,94	44,88	6,02	5,89	1,27

**Anexo C. Enzimas hepáticas para cada uno de los periodos y los grupos. El día -30 y -15 corresponden a periodos preparto y el Día 0 al parto. DE= Desviación estándar.**

PERIODO	GRUPO	ENZIMAS			
		ALT (U/l)		AST (U/l)	
		Media	DE	Media	DE
Día -30	T1	21,55	3,33	56,51	8,32
	T2	18,49	5,75	60,75	15,69
	T3	22,68	3,41	71,77	15,54
Día -15	T1	26,81	4,62	59,78	7,72
	T2	17,84	3,75	65,65	7,84
	T3	21,03	4,28	61,86	5,49
Día 0	T1	20,21	2,65	75,95	8,87
	T2	18,49	4,04	70,87	14,88
	T3	17,94	4,89	71,08	13,86
Día 15	T1	22,11	5,25	72,33	10,31
	T2	20,07	4,18	66,19	13,21
	T3	17,69	3,89	71,48	17,01
Día 30	T1	23,25	5,13	63,53	5,89
	T2	22,99	3,73	70,01	16,35
	T3	19,45	4,17	64,85	13,83
Día 45	T1	24,95	2,21	68,97	12,47
	T2	21,38	1,59	67,37	18,41
	T3	21,87	3,53	61,85	11,65
Día 60	T1	25,78	4,49	62,25	8,34
	T2	24,30	5,26	60,62	11,38
	T3	21,39	5,66	66,06	10,65
Día 75	T1	26,56	1,53	57,74	5,76
	T2	23,62	4,40	61,77	6,86
	T3	25,77	5,45	60,02	5,35
Día 90	T1	29,76	2,76	61,45	2,61
	T2	23,23	5,43	66,02	15,91
	T3	24,95	1,71	62,84	4,54
Día 105	T1	26,99	1,78	62,90	7,44
	T2	25,24	1,52	70,72	20,38
	T3	21,97	2,43	67,10	7,85



**Anexo D. Concentración de hormonas para cada uno de los periodos y los grupos. El día -30 y -15 corresponden a periodos preparto y el Día 0 al parto. DE= Desviación estándar.**

PERIODO	GRUPO	HORMONAS							
		Insulina (pmol/L)		T3 (nmol/L)		T4 (nmol/L)		Cortisol (nmol/L)	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Día -30	T1	137,28	37,12	2,23	0,34	71,35	18,02	167,04	93,60
	T2	186,11	15,07	2,60	0,53	59,15	7,85	383,87	299,87
	T3	134,46	37,08	2,32	0,43	60,67	9,02	293,77	248,42
Día -15	T1	78,81	18,76	2,23	0,23	50,98	14,99	229,67	149,98
	T2	158,59	37,11	2,38	0,23	51,85	11,88	289,19	256,04
	T3	156,07	51,07	2,29	0,21	48,54	9,74	253,61	223,55
Día 0	T1	53,62	8,53	1,96	0,16	40,63	12,91	72,98	53,90
	T2	101,04	39,15	1,88	0,57	41,58	8,65	46,14	36,85
	T3	127,89	53,77	1,98	0,35	46,33	5,76	112,70	103,75
Día 15	T1	63,21	25,85	1,92	0,35	35,30	12,70	165,28	155,67
	T2	73,96	22,21	2,05	0,44	37,87	7,16	85,39	57,71
	T3	87,59	17,04	1,75	0,45	46,80	9,10	149,45	122,06
Día 30	T1	65,91	15,21	2,03	0,33	41,74	7,08	190,15	132,60
	T2	71,67	16,92	2,23	0,32	49,06	1,59	232,29	211,46
	T3	122,15	55,57	2,15	0,43	47,07	10,58	177,25	118,34
Día 45	T1	85,17	20,07	1,86	0,34	31,23	5,37	123,58	74,71
	T2	84,70	27,89	2,31	0,61	49,47	8,49	132,62	76,22
	T3	131,50	36,40	1,95	0,39	49,35	9,17	186,95	120,71
Día 60	T1	86,96	29,15	1,79	0,24	40,45	9,25	141,90	83,80
	T2	131,84	32,35	2,08	0,46	48,17	6,56	141,40	73,90
	T3	178,19	79,41	2,10	0,41	50,93	8,10	188,92	149,83
Día 75	T1	117,61	32,85	1,94	0,31	44,86	9,41	182,28	158,71
	T2	107,63	21,86	2,10	0,42	53,50	10,35	159,00	62,54
	T3	117,76	45,03	2,18	0,46	56,26	19,30	164,35	138,01
Día 90	T1	105,19	25,31	2,18	0,53	39,92	12,88	217,94	239,92
	T2	161,47	57,82	2,00	0,48	46,98	6,45	113,00	47,71
	T3	144,75	59,74	2,47	0,58	47,28	7,25	313,54	336,57
Día 105	T1	127,80	46,09	1,80	0,43	41,62	7,46	160,43	115,01
	T2	161,15	58,12	1,99	0,55	46,88	5,44	177,59	67,94
	T3	155,13	70,44	2,28	0,37	55,16	14,63	290,21	291,20

**Anexo E. Minerales séricos para cada uno de los periodos y los grupos. El día -30 y -15 corresponden a periodos preparto y el Día 0 al parto. DE= Desviación estándar.**

PERIODO	GRUPO	MINERALES SERICOS					
		Calcio (mmol/L)		Fósforo (mmol/L)		Magnesio (mmol/L)	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE
Día -30	T1	2,55	0,04	2,47	0,30	0,86	0,08
	T2	2,38	0,29	2,26	0,26	0,91	0,10
	T3	2,58	0,12	2,56	0,42	0,94	0,10
Día -15	T1	2,60	0,24	2,37	0,15	0,91	0,10
	T2	2,44	0,34	2,11	0,21	0,89	0,08
	T3	2,57	0,13	2,48	0,25	1,00	0,11
Día 0	T1	2,17	0,14	2,14	0,22	0,99	0,12
	T2	2,26	0,33	1,89	0,25	0,84	0,10
	T3	2,29	0,20	2,54	0,43	0,87	0,10
Día 15	T1	2,43	0,17	2,32	0,21	0,97	0,14
	T2	2,29	0,27	2,00	0,25	0,89	0,18
	T3	2,35	0,17	2,36	0,34	1,00	0,10
Día 30	T1	2,56	0,11	2,03	0,19	1,00	0,11
	T2	2,50	0,23	1,94	0,21	0,88	0,09
	T3	2,52	0,20	2,11	0,32	0,94	0,07
Día 45	T1	2,57	0,06	2,09	0,27	0,94	0,09
	T2	2,63	0,24	1,85	0,17	0,92	0,09
	T3	2,34	0,11	2,00	0,23	0,88	0,13
Día 60	T1	2,65	0,21	2,08	0,18	0,94	0,08
	T2	2,55	0,18	1,90	0,14	0,87	0,05
	T3	2,42	0,24	2,22	0,31	0,86	0,13
Día 75	T1	2,62	0,16	2,07	0,21	0,96	0,07
	T2	2,43	0,23	1,81	0,21	0,87	0,13
	T3	2,52	0,16	2,28	0,33	1,01	0,05
Día 90	T1	2,62	0,17	2,16	0,18	0,91	0,08
	T2	2,62	0,16	1,88	0,08	0,89	0,03
	T3	2,38	0,14	2,52	0,31	0,85	0,09
Día 105	T1	2,40	0,47	2,12	0,23	0,94	0,07
	T2	2,41	0,35	1,76	0,19	0,92	0,11
	T3	2,37	0,19	2,38	0,39	0,83	0,14

**Anexo F. Leucograma y hematocrito para cada uno de los periodos y los grupos. El día -30 y -15 corresponden a periodos preparto y el Día 0 al parto. DE= Desviación estándar.**

PERIO- DO	GRU- PO	LEUCOCITOS Y HEMATOCRITO											
		Neutrófilos (%)		Linfocitos (%)		Eosinófilos (%)		Monocitos (%)		Basófilos (%)		Hematocrito (%)	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Día -30	T1	26,3	7,5	67,0	11,4	6,0	5,6	0,7	1,2	0,0	0,0	30,7	3,8
	T2	23,6	6,5	70,3	8,2	5,1	3,4	0,7	0,8	0,1	0,4	30,3	1,0
	T3	25,6	4,5	71,3	5,6	2,9	2,1	0,3	0,5	0,0	0,0	29,3	1,0
Día -15	T1	20,3	3,6	75,1	6,9	3,3	2,0	0,1	0,4	0,1	0,4	30,9	2,5
	T2	28,9	7,4	65,7	7,7	4,7	3,0	0,7	0,8	0,0	0,0	30,1	0,9
	T3	27,1	1,9	69,1	3,2	2,3	1,0	1,0	1,0	0,4	0,5	31,4	3,4
Día 0	T1	24,4	7,6	76,3	5,2	0,6	0,5	0,9	1,2	0,0	0,0	29,7	2,9
	T2	28,6	6,3	66,1	5,7	3,3	3,2	1,4	1,1	0,3	0,5	28,7	1,4
	T3	27,0	5,9	70,1	5,9	1,3	1,3	1,0	1,0	0,4	0,8	26,3	3,1
Día 15	T1	26,0	7,5	70,3	8,4	2,6	1,8	1,0	1,3	0,1	0,4	28,0	3,7
	T2	26,3	5,2	66,0	5,2	5,6	2,1	1,9	1,1	0,3	0,5	27,0	2,2
	T3	26,0	2,6	67,6	4,7	4,9	1,8	1,1	1,5	0,3	0,8	25,9	2,6
Día 30	T1	26,6	5,3	68,7	6,2	3,3	3,3	1,1	1,1	0,3	0,5	27,7	2,1
	T2	29,1	6,9	65,1	6,9	5,1	2,8	0,9	0,7	0,1	0,4	26,0	2,2
	T3	26,6	6,4	65,1	7,9	6,0	2,9	1,0	1,2	0,1	0,4	26,6	2,9
Día 45	T1	25,3	4,8	69,9	6,6	3,4	2,9	0,9	0,7	0,6	0,8	26,0	1,7
	T2	25,9	5,4	68,4	5,6	4,3	2,1	1,0	0,6	0,4	0,8	26,7	0,8
	T3	24,0	1,4	69,4	2,8	5,6	2,2	0,9	1,1	0,1	0,4	27,1	2,5
Día 60	T1	24,6	4,2	69,7	4,5	4,1	2,0	0,7	1,3	0,1	0,4	26,9	1,8
	T2	26,9	5,5	65,3	6,2	5,7	3,0	1,3	1,0	0,4	0,8	27,9	1,7
	T3	25,6	6,8	69,4	7,0	3,0	1,7	1,3	1,1	0,0	0,0	28,3	3,5
Día 75	T1	25,6	5,9	62,4	8,2	4,4	2,0	0,7	0,5	0,6	1,0	26,3	2,6
	T2	27,0	7,7	64,7	6,5	6,3	3,6	1,6	1,3	0,3	0,8	27,6	2,2
	T3	27,7	7,1	69,4	7,0	4,0	2,2	1,3	1,1	0,0	0,0	28,1	2,9
Día 90	T1	31,6	8,0	64,0	7,0	3,3	2,1	0,7	0,8	0,4	0,8	26,4	3,6
	T2	28,8	6,9	62,2	9,0	7,8	3,9	1,0	0,9	0,2	0,4	27,3	2,2
	T3	25,9	5,5	67,0	7,4	6,0	2,2	0,6	0,8	0,0	0,0	28,4	2,6
Día 105	T1	27,0	8,8	67,1	8,6	4,3	2,7	1,1	1,1	0,4	0,8	27,1	2,8
	T2	27,8	6,9	66,0	7,3	4,7	2,5	1,3	1,2	0,2	0,4	27,2	1,7
	T3	27,9	6,9	67,3	7,8	3,1	1,1	0,7	0,8	0,0	0,0	28,6	3,2

**Anexo G. Producción y composición de leche para cada uno de los periodos y los grupos. DE= Desviación estándar.**

PERIO- DO	GRU- PO	PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LECHE											
		Producción L/vaca/día		Grasa (%)		Lactosa (%)		Proteína (%)		SNG (%)		Minerales (%)	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Día 15	T1	23,75	7,11	3,5	0,3	4,8	0,3	3,1	0,2	8,5	0,5	0,7	0,0
	T2	24,06	4,99	3,6	0,4	4,7	0,3	3,0	0,2	8,4	0,6	0,7	0,0
	T3	22,99	6,58	3,4	0,2	4,8	0,2	3,1	0,1	8,6	0,4	0,7	0,0
Día 30	T1	25,19	7,23	3,4	0,3	4,8	0,3	3,1	0,2	8,5	0,5	0,7	0,0
	T2	26,47	4,76	3,5	0,3	4,7	0,3	3,0	0,2	8,3	0,5	0,7	0,0
	T3	23,53	7,11	3,4	0,1	4,7	0,1	3,0	0,1	8,4	0,2	0,7	0,0
Día 45	T1	25,80	6,71	3,4	0,3	4,8	0,3	3,1	0,2	8,5	0,5	0,7	0,0
	T2	26,96	4,87	3,5	0,3	4,7	0,3	3,0	0,1	8,5	0,6	0,7	0,0
	T3	24,36	7,41	3,5	0,4	4,7	0,2	3,0	0,2	8,4	0,4	0,7	0,0
Día 60	T1	26,03	6,86	3,4	0,2	4,7	0,3	3,0	0,2	8,4	0,5	0,7	0,0
	T2	27,67	5,25	3,6	0,3	4,6	0,2	3,0	0,1	8,3	0,4	0,7	0,0
	T3	24,64	7,33	3,4	0,5	4,7	0,1	3,0	0,1	8,4	0,2	0,7	0,0
Día 75	T1	25,09	6,74	3,4	0,4	4,8	0,3	3,1	0,2	8,5	0,5	0,7	0,0
	T2	26,46	4,45	3,5	0,5	4,6	0,3	3,0	0,2	8,3	0,6	0,7	0,1
	T3	23,71	7,11	3,4	0,2	4,7	0,1	3,0	0,1	8,4	0,2	0,7	0,0
Día 90	T1	24,59	6,85	3,3	0,3	4,8	0,4	3,1	0,2	8,5	0,6	0,7	0,1
	T2	25,53	4,89	3,6	0,5	4,6	0,2	3,0	0,2	8,2	0,3	0,7	0,0
	T3	23,25	7,39	3,5	0,4	4,7	0,2	3,0	0,1	8,3	0,3	0,7	0,0
Día 105	T1	24,05	6,80	3,4	0,2	4,7	0,1	3,1	0,1	8,4	0,1	0,7	0,0
	T2	25,03	4,66	3,7	0,2	4,6	0,1	3,0	0,1	8,3	0,1	0,7	0,0
	T3	23,11	7,45	3,6	0,3	4,7	0,1	3,0	0,1	8,5	0,2	0,7	0,0

**Anexo H. Índices de resistencia insulínica para cada uno de los periodos y los grupos. El día -30 y -15 corresponden a periodos preparto y el Día 0 al parto. DE= Desviación estándar.**

PERIODO	GRUPO	ÍNDICES DE RESISTENCIA INSULÍNICA							
		HOMA		QUICKI		RQUICKI		RQUICKI BHB	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Día -30	T1	72,05	25,64	0,32	0,01	0,41	0,06	0,47	0,09
	T2	90,06	16,83	0,31	0,01	0,39	0,02	0,43	0,02
	T3	54,40	14,87	0,34	0,01	0,43	0,04	0,49	0,06
Día -15	T1	43,80	14,77	0,35	0,02	0,42	0,05	0,48	0,07
	T2	74,72	25,26	0,32	0,01	0,38	0,02	0,42	0,04
	T3	67,15	24,69	0,33	0,02	0,40	0,04	0,48	0,05
Día 0	T1	18,11	1,83	0,40	0,01	0,44	0,04	0,44	0,09
	T2	31,71	19,30	0,38	0,04	0,42	0,03	0,42	0,03
	T3	53,22	27,16	0,34	0,03	0,42	0,04	0,44	0,06
Día 15	T1	23,45	13,97	0,39	0,04	0,48	0,05	0,47	0,10
	T2	23,57	11,69	0,39	0,03	0,48	0,03	0,49	0,04
	T3	31,99	8,52	0,36	0,02	0,46	0,02	0,48	0,02
Día 30	T1	27,28	8,27	0,37	0,02	0,49	0,04	0,50	0,07
	T2	19,88	6,60	0,40	0,02	0,51	0,04	0,53	0,11
	T3	44,15	26,06	0,35	0,03	0,47	0,05	0,48	0,08
Día 45	T1	28,59	12,14	0,37	0,03	0,50	0,06	0,52	0,13
	T2	30,59	15,66	0,37	0,03	0,47	0,04	0,49	0,03
	T3	44,34	9,97	0,35	0,01	0,47	0,03	0,51	0,05
Día 60	T1	33,81	10,85	0,36	0,02	0,50	0,07	0,52	0,12
	T2	45,65	16,01	0,35	0,02	0,45	0,02	0,48	0,05
	T3	60,44	23,73	0,33	0,02	0,45	0,04	0,47	0,05
Día 75	T1	50,92	18,87	0,34	0,02	0,47	0,08	0,49	0,11
	T2	36,48	11,45	0,36	0,02	0,49	0,05	0,54	0,08
	T3	45,75	19,91	0,35	0,03	0,48	0,05	0,49	0,05
Día 90	T1	39,55	14,72	0,36	0,02	0,50	0,06	0,54	0,09
	T2	61,58	28,62	0,33	0,02	0,45	0,05	0,49	0,05
	T3	51,35	19,81	0,34	0,02	0,48	0,05	0,49	0,06
Día 105	T1	51,58	18,26	0,34	0,02	0,47	0,07	0,50	0,09
	T2	57,39	24,41	0,34	0,02	0,46	0,08	0,51	0,08
	T3	67,12	35,35	0,33	0,02	0,45	0,04	0,47	0,05



## Bibliografía

Abuelo, A.; Hernández, J.; Benedito, J.; y Castillo, C. 2014. A comparative study of the metabolic profile, insulin sensitivity and inflammatory response between organically and conventionally managed dairy cattle during periparturient period. *Animal*, 8 (9): 1516-1525.

Adrien, M. L.; Mattiauda, D. A.; Artegoitia, V.; Carriquiry, M.; Motta, G.; Bentancur, O.; y Meikle, A. 2012. Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of post-partum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal*, 6 (2): 292–299.

Akins, M. S.; Bertics, S. J.; Socha, M. T.; y Shaver, R. D. 2013. Effects of cobalt supplementation and vitamin B12 injections on lactation performance and metabolism on Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96 (3): 1755–1768.

Ametaj, B. 2005. A New Understanding of the Causes of Fatty Liver in Dairy Cows. *Advances in Dairy Technology*, 17: 97-112.

Aschenbach, J.; Kristensen, N.; Donkin, S.; Hammon, H.; y Penner, G. 2010. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour Dough. *IUBMB Life*, 62 (12): 869 – 877.

Balogh, O.; Szepes, O.; Kovacs, K.; Kulcsar, M.; Reiczigel, J.; Alcazar, J.; y Keresztes, M.; Febel, H.; Bartyik, J.; Fekete, G.; Fesus, L.; y Huszenicza, G. 2008. Interrelationships of growth hormone *ALuI* polymorphism, insulin resistance, milk production and reproductive performance in Holstein-Friesian cows. *Veterinari Medicina*, 53 (11): 604-616.

Begum, I.; Azim, A.; Akhter, S.; Anjum, M. I.; y Afzal, M. 2009. Mineral Dynamics of Blood and Milk in Dairy Buffaloes Fed on Calcium and Phosphorus Supplementation. *Pak Vet J*, 30 (2): 105-109.

Berge, A.; y Vertenten, G. 2014. A field study to determine the prevalence, dairy herd management systems, and fresh cow clinical conditions associated with ketosis in western European dairy herds. *J. Dairy Sci.* 97 (4): 2145–2154.

Bicalho, M. L.; Lima, F. S.; Ganda, E. K.; Foditsch, C.; Meira, E. B.; Machado, V. S.; Teixeira, A. G.; Olkonomou, G.; Gilbert, R. O.; y Bicalho, R. C. 2014. Effect of trace mineral supplementation on selected minerals, energy metabolites, oxidative stress, and immune parameters and its association with uterine diseases in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97 (7): 4281–4295.

Bionar, M.; Loor, J. 2008. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics*. 9 (366): 1 – 21.

Bisinotto, R. S.; Greco, L. F.; Ribeiro, E. S.; Martinez, N.; Lima, F. S.; Staples, C. R.; Thacher, W. W.; y Santons, J. E. 2012. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Anim Reprod*, 9 (3): 260-272.

Bossaert, P.; Leroy, J.; Vlieghe, S.; y Opsome, G. 2008. Interrelations between glucose – Induced Insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high – yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91 (9): 3363–3371.

Burgos, S. A.; Embertson, N. M.; Zhao, Y.; Mitloehner, F. M.; DePeters, E.J.; y Fadel, J. G. 2010. Prediction of ammonia emission from dairy cattle manure base on milk urea nitrogen: Relation of milk urea nitrogen to ammonia emissions. *J. Dairy Sci.*, 93 (6): 2377 – 2386.

Calamari, L.; Petrera, F.; Abeni, F.; y Bertin, G. 2011. Metabolic and hematological profiles in heat stressed lactating dairy cows fed diets supplemented with different selenium sources and doses. *Livestock Science*, 142 (3): 128 – 137.



Calvache, I.; y Navas, A. 2000. Factores que influyen en la composición nutricional de la leche. *Rev. Cienc. Anim.* 5: 73 - 85.

Campos, R.; Cubillos, C.; y Rodas, A. 2007. Indicadores metabólicos en razas lecheras especializadas en condiciones tropicales en Colombia. *Acta Agronómica*, 56 (2): 85 – 92.

Campos, R.; y Giraldo, L. 2008. Efecto de la raza y la edad sobre las concentraciones de hormonas tiroideas T3 y T4 de bovinos en condiciones tropicales. *Acta Agronómica*, 57 (2): 137 – 141.

Cañas, J.; Cerón, M.; y Corrales, J. 2012. Modelación y parámetros genéticos de curvas de lactancia en bovinos Holstein en Colombia. *Rev. MVZ Córdoba*, 17 (2): 2998 - 3003.

Cardoso, F. 2012. Relationships among nutritional regimen, metabolic disorders, reproduction, and production in dairy cows during the transition period. Tesis doctoral. Universidad de Illinois, Urbana-Champaign. Urbana, Illinois.

Cartwright, M.; Hajja, W.; Al-khatib, S.; Hazeghazam, M.; Sreedhar, D.; Na Li, R.; Wong-McKinstry, E.; y Carlson, R. 2012. Toxigenic and metabolic causes of ketosis and ketoacidotic syndromes. *Crit Care Clin*, 28 (4): 601 – 631.

Carrier, J.; Stewart, S.; Godden, S.; Fetrow, J.; y Rapnicki, P. 2004. Evaluation and use of three cowside test for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows. *J. Dairy Sci.*, 87 (11): 3725 – 3735.

Ceballos, A.; Villa, N.; Betancourth, T.; Roncancio, D. 2004. Determinación de la concentración de calcio, fósforo y magnesio en el periparto de vacas lecheras en Manizales, Colombia. *Rev Col Cienc Pec*, 17 (2): 125 – 133.

Chapinal, N.; Carson, M. E.; LeBlanc, S. J.; Leslie, K. E.; Godden, S.; Capel, M.; y Santos, J. E. 2012. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *J. Dairy Sc*, 95 (3): 1301–1309.

Cozzi, G.; Ravarotto, T.; Gottardo, F.; Stefani, A.; Contiero, B.; Moro, L.; Brscic, M.; y Dalvit, P. 2011. Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein

dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. *J. Dairy Sci.*, 94 (8): 3895 – 3901.

Contreras, G. A.; O'Boyle, N. J.; Herdt, T. H.; y Sordillo, L. M. 2010. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *J Dairy Sci*, 93 (6): 2508 – 2516.

Contreras, G.; y Sordillo, L. M. 2011. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Com Immunol Microbiol Infect Dis*, 34 (3); 281 – 289.

Coonen, J. M.; Maroney, M. J.; Crump, P. M.; y Grummer, R. R. 2011. *Short communication*: Effect of a stable pen management strategy for precalving cows on dry matter intake, plasma nonesterified fatty acid levels, and milk production. *J Dairy Sci*, 94 (5): 2413 – 2417.

Cucunubo, L.; Barboza, C.; Wittwer, F.; Noro, M. 2013. Diagnóstico de cetosis subclínica y balance energético negativo en vacas lecheras mediante el uso de muestras de sangre, orina y leche. *DCV-LUZ*, XXIII (2): 111 – 119.

Dezfouli, M.; Eftekhari, Z.; Sadeghian, S.; Bahounar, A.; y Jeloudari, M. 2013. Evaluation of hematological and biochemical profiles in dairy cows with left displacement of the abomasum. *Comp Clin Pathol* 22 (1): 175-179.

Di Rienzo J. A.; Casanoves F.; Balzarini M. G.; Gonzalez L.; Tablada M.; Robledo C. W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>

Djokovic, R.; Samanc, H.; Jovanovic, M.; y Nikolic, Z. 2007. Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and content of lipids in the liver in dairy cows in transitional period. *Acta vet. Brno.*, 76 (4): 525 – 532.

Duffield, T.; Lissemore, K.; McBride, B.; y Leslie, K. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.*, 92 (2): 571 – 580.

Duque, M.; Olivera, M.; y Rosero, R. 2011. Metabolismo energético en vacas durante la lactancia temprana y el efecto de la suplementación con grasa protegida. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 24: 74-82.

Drackley, J.; Dann, H.; Neil, D.; Janovick, N.; Litherland, N.; Underwood, J.; y Loor, J. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. J. Anim. Sci*, 4 (4): 323 – 344.

Esposito, G.; Irons, P. C.; Webb, E. C.; y Chapwanya, A. 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 144 (3-4): 60 – 71.

Fenwick, M.; Fitzpatrick, R.; Kenny, D.; Diskin, M.; Patton, J., Murphy, J., y Wathes, C. 2008. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domestic Anim Endocrinol*, 34 (1): 31-44.

Galvis, R.; Munera, E.; y Marín, A. 2005. Relación entre el mérito genético para la producción de leche y el desempeño metabólico y reproductivo en la vaca de alta producción. *Rev Col Cienc Pec*, 18 (3): 228-239.

García, A.; Cardoso, C.; Campos, R.; Thedy, D.; y Gonzalez, F. 2011. Metabolic evaluation of dairy cows submitted to three different strategies to decrease the effects of negative energy balance in early postpartum. *Pesq Vet Bras*, 31 (1): 11-17.

Gellrich, K. 2012. Metabolic and productive characterization of multiparous cows grouped for fat-corrected milk yield and milk protein concentration. Tesis medicina veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Munich, Munich.

Goff, J. 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet J*, 176 (1): 50 – 57.

Gonzalez, F.; Muiño, R.; Pereira, V.; Campos, R.; y Benedito, J. 2011. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *J. Vet. Sci*, 12 (3): 251 - 255.

Guyot, H.; Alves de Oliveira, L.; Ramery, E.; Franc, J.; beckers, O.; y Rollin, F. 2011. Effect of a combined iodine and selenium supplementation on I and Se status of cows and their calves. *J Trace Elem Med and Biol*, 25 (2): 118–124.

Granados, M.; Ortiz, M.; Montúfar, I.; y Menjívar, M. 2014. Micronutrientes y diabetes, el caso de los minerales. *Cirugía y Cirujanos*, 82 (1): 119 -125.

Gross, J.; Schwarz, F. J.; Eder, K.; Van Dorland, H. A.; y Bruckmaier, R. M. 2013. Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *J Dairy Sci*, 96 (8): 5008 – 5017.

Gross, J.; Van Dorland, H.; Schwarz, F.; y Bruckmaier, R. 2011. Endocrine changes and liver mRNA abundance of somatotrophic axis and insulin system constituents during negative energy balance at different stages of lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94 (7): 3484-3494.

Grummer, R. 2008. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet J*, 176 (1): 10 – 20.

Grummer, R. R.; Wiltbank, M. C.; Fricke, P. M.; Watters, R. D.; y Silva del Rio, N. 2010. Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *J Reprod dev*, 56: S22-S28.

Haarstrich, D. 2011. Insulinsensitivität und Insulinresponse nach einer Langzeit-Supplementation von konjugierten Linolsäuren bei laktierenden Milchkühen. Tesis doctoral. Universidad “Tierärztliche Hochschule Hannover”, Baja Sajonia, Alemania.

Hayirli, A. 2006. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet Res Commun*, 30 (7): 749 – 774.

Hayirli, A.; Bertics, S. J.; y Grummer, R. R. 2002. Effects of slow-release insulin on production, liver triglyceride, and metabolic profiles of Holstein in early lactation. *J Dairy Sci*, 85 (9): 2180 – 2191.

Heemstra, K.; Van Der Deure, W.; Peeters, R.; Hamdy, N.; Stokkel, M.; Corssmit, E.,... Smit, J. 2008. Thyroid hormone independent associations between serum TSH levels and indicators of bone turnover in cured patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur Endocrinol*, 159 (1): 69 – 76.

Holdridge, L. 1987. Ecología basada en zonas de vida. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), San José, Costa Rica. 9 p.

Holtenius, P.; y Holtenius, K. (2007). A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49 (29): 1 - 3.

Huszenicza, G.; Kulcsar, M.; y Rudas, P. 2002. Clinical endocrinology of thyroid gland function in ruminants. *Vet. Med. – Czech*, 47 (7): 199 – 210.

Huzzey, J. M.; Nydam, D. V.; Grant, R. J.; y Overton, T. R. 2011. Associations of prepartum plasma cortisol, haptoglobin, fecal cortisol metabolites, and nonesterified fatty acids with postpartum health status in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94 (12): 5878 – 5889.

Ingvarsen, K. 2006. Feeding- and management-related diseases in the transition cow physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Anim Feed Sci Tech*, 126 (3-4): 175 – 213.

Iwersen, M.; Klein-Jöbstl, D.; Pichler, M.; Roland, L.; Fidschuster, B.; Schwendenwein, I.; y Drillich, M. 2013. Comparison of 2 electronic cowside tests to detect subclinical ketosis in dairy cows and the influence of the temperature and type of blood sample on the test results. *J Dairy Sci*, 96 (12): 7719 – 7730.

Jaakson, H. 2012. Insulin resistance in dairy cows in reference to breed, body condition and milk yield. Tesis doctoral. *Universidad de Estonia de Ciencias de la Vida*. Tartu, Estonia.

Jaakson, H.; Ling, K.; Samarütel, J.; Ilves, A.; Kaart, T.; Kärt, O.; y Ots, M. 2013. Blood glucose and insulin responses during the glucose tolerance test in relation to dairy cow body condition and milk yield. *Vet Med Zoot*, 62 (84): 28-35.

Jing, X.; Li, D.; Olofsson, C.; Salehi, A.; Surve, V.; Caballero, J.; Ivarsson, R.; Lundquist, I.; Pereverzev, A.; Schneider, T.; Rorsman, P.; y Renstrom, E. 2005. Cav2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (1): 146 – 154.

Jones, M.; y Allison, R. 2007. Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 23 (3): 377 - 402.

Jouany, J. P. 2006. Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Anim Reprod Sci*, 96 (3-4): 250 – 264.

Jozwik, A.; Strzalkowska, N.; Bagnicka, E.; Grzybek, W.; Krzyzewski, J.; Polawska, E.; Kolata, A.; y Horbannczuk, J. 2012. Relationship between milk yield, stage of lactation, and some blood serum metabolic parameters of dairy cows. *Czech J. Anim. Sci.*, 57 (8): 353 – 360.

Juchem, S. O.; Robinson, P. H.; y Evans, E. 2012. A fat based rumen protection technology post- ruminally delivers a B vitamin complex to impact performance of multiparous Holstein cows. *Anim Feed Sci Tech*, 174 (1-2): 68 – 78.

Kaneko J. J.; Harvey J. W.; y Bruss M. L. 2008. Clinical biochemistry of domestic animals. 6th ed., Academic Press, Inc. San Diego.

Kashfi, H.; yazdani, A. R.; Latifi, M.; y Bidabadi, F. S. 2011. Economic and managerial analysis of effective managerial strategies on prevention from ketosis in transition period in shahrud commercial dairy farms. *ISRN Vet Sci*, ID 605179, 1-8.

Kawashima, C.; Fukihara, S.; Maeda, M.; Kaneko, E.; Amaya, C.; Matsui, M.; Shimizu, T.; Matsunaga, N.; Kida, K.; Miyake, Y.; Shams, D.; y Miyamoto, D. 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. *Reproduction*, 133 (1): 155 – 163.

Keskin, M.; Kurtoglu, S.; kendirci, M.; Atabek, E.; y Yazici, C. 2005. Assessing insulin resistance among obese children and adolescents Glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for homeostasis model assessment is more reliable an the fasting. *Pediatrics*, 115 (4): e500-e503.

Kerestes, M. 2010. Role of insulin in the development of metabolic and reproductive malfunctions of periparturient dairy cows. Tesis doctoral. Universidad Szent István, Gödöllő, Hungría.

Kerestes, M.; Faigl, V.; Kulcsár, M.; Balogh, O.; Földi, J.; Fébel, H.; Chilliard, Y.; y Huszenicza, G. 2009. Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis. *Domest Anim Endocrinol*, 37 (4): 250-261.

Koster, J.; y Opsomer, G. 2013. Insulin resistance in dairy cows. *Vet Clin Food Anim*, 29 (2): 299 – 322.

Kusenda, M. 2010. Insulin-Sensitivität und Insulin-Response nach einer einmaligen Dexamethasonbehandlung bei Milchkühen in der Früh-laktation. Tesis doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Hannover, Hannover.

Krogh, M. A.; Toft, N.; y Enevoldsen, C. 2011. Latent class evaluation of a milk test, a urine test, and the fat-to-protein percentage ratio in milk to diagnose ketosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 94 (5): 2360 – 2367.

Leblanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J. reprod. Dev.*, 56, S29 – S35.

Lee, H.; Kida, K.; Miura, R.; Inokuma, H.; Miyamoto, A.; kawashima, C.; haneda, S.; Miyake, Y.; y Matsui, M. 2012. Slow recovery of blood glucose in the insulin tolerance test during the prepartum transition period negatively impacts the nutritional status and reproductive performance postpartum of dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.*, 74 (4): 457 – 464.

Lean, I. J.; VanSaun, R.; y Degaris, P. J. 2013. Energy and protein nutrition management of transition dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 29 (2): 337 – 366.

Liu, P.; He, B.; Yang, X.; Hou, X.; Yang, H.; Han, Y.; Nie, P.; Deng, H.; y Cheng, L. 2012. Activities of Aspartate aminotransferase, Alanine aminotransferase, Gamma-glutamyltransferase, Alkaline phosphatase in plasma of postpartum Holstein cows. *J. Anim. Vet. Adv.*, 11 (8): 1270 – 1274.

Liu, L., Chen, Y., y Yang, L. (2014). Inhibition study of alanine aminotransferase enzyme using sequential online capillary electrophoresis analysis. *Analytical Biochemistry*, 467: 28- 30.

Lomander, H.; Frössling, J.; Ingvarsen, K. L.; Gustafsson, H.; y Svenson, C. 2012. Supplemental feeding with glycerol or propylene glycol of dairy cows in early lactation—Effects on metabolic status, body condition, and milk yield. *J Dairy Sci*, 95 (5): 2397 – 2408.

Loor, J.; Bionaz, M.; Drackley, J. 2013. Systems Physiology in Dairy Cattle: Nutritional Genomics and Beyond. *Annu Rev Anim Biosci.* 1:365-392.

McCarthy, S. D.; Waters, S. M.; Kenny, D. A.; Diskin, M. G.; Fitzpatrick, R.; patton, J.; Wathes, D. C.; y Morris, D. G. 2010. Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: a global approach. *Physiol Genomics*, 42<sup>a</sup>: 188–199.

Moharrery, A. 2004. Investigation of different levels of RDP in the ratios of lactating cows and their effects on MUN, BUN and urinary N excretion. *Ital. J. Anim. Sci.*, 3: 157 – 165.

Mohebbi, M.; Nazifi, S.; Rowghani, E.; Bahrami, S.; y Jamshidi, O. 2009. Thyroid hormones and their correlations with serum glucose, beta hydroxybutyrate, nonesterified fatty acids, cholesterol, and lipoproteins of high-yielding dairy cows at different stages of lactation cycle. *Comp Clin Pathol*, 18 (3): 211 – 216.

Morales, C.; y Rodríguez, N. 2005. Hormonas tiroideas en la reproducción y en la producción láctea del ganado lechero: revisión de literatura. *Rev Col Cienc Pec*, 18 (2): 136 – 148.



- Moyes, K. M.; Drackley, J. K.; Salak-Johnson, J. L.; Morin, D. E.; Hope, J. C.; y Loor, J. J. 2009. Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a *Streptococcus Uberis* mastitis challenge in dairy cows during midlactation. *J. Dairy Sci.*, 92 (9): 4301 – 4316.
- Mulligan, F. J.; y Doherty, M. L. 2008. Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal* 176 (1): 3 – 9.
- Muniyappa, R.; Sihoon, L.; Chen, H.; y Quon, M. 2008. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294: E15-E26.
- Nazifi, S.; Ahmadi, M.; y Gheisari, H. 2008. Hematological changes of dairy cows in postpartum period and early pregnancy. *Comp Clin Pathol*, 17(1): 157-163.
- Neville, M.; McFadden, T.; y Forsyth, I. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7 (1): 49-66.
- Noro, M.; Vargas, V.; Pulido, R.; y Wittwer, F. 2006. Efecto del tipo de concentrado sobre indicadores sanguíneos del metabolismo de energía y de proteínas en vacas lecheras en pastoreo primaveral. *Arch. Med. Vet.* 38 (3): 227-232.
- Noro, M.; Barboza, C. 2012. Cetosis en rebaños lecheros: presentación y control. *Spei Domus*. 8 (17): 1 - 11.
- Nozad, S.; Ramin, A.; Moghaddam, G.; Asri-rezaei, S.; y Kalantary, L. 2014. Monthly evaluation of blood hematological, biochemical, mineral and enzyme parameters during the lactation period in Holstein dairy cows. *Comp Clin Pathol*, 23 (2): 275-281.
- Olivares, J. A.; y Arellano, A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB* 27 (1): 9-18.
- Onita, P.; y Colibar, O. 2009. Energy, protein and mineral profile in periparturient period at dairy cows. *Lucrări Stiintifice Medicină Veterinară*, XLII (2): 398 – 404.

Osorio, M; y Segura, J. 2011. Sustentabilidad de los sistemas de producción bovina en el trópico: Mejoramiento genético. *Livestock Research for Rural Development*, 23 (8). (Consultado: Mayo 26, 2015) Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd21/7/notestoauthors.htm>.

Ospina, P.; Nydam, D.; Stokol, T.; y Overton, T. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hidroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J. Dairy Sci*, 93 (2): 546-554.

Pal, P.; y Bhatta, R. 2013. Determination of blood metabolites in cross HF cattle at pre-parturient stage: reference value. *Int. J. Pharm. Med. & Bio. Sc.* 2 (1): 53-57.

Preynat, A.; Lapierre, H.; Thivierge, M.; Palin, M.; Matte, J.; Desrochers, A.; y Girard, L. 2009. Effects of supplements of folic acid, vitamin B12, and rumen-protected methionine on whole body metabolism of methionine and glucose in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 92 (2): 677 – 689.

Quiroz, G.; LeBlanc, S.; Duffield, T.; Wood, D.; Leslie, K.; y Jacobs, R. 2009. Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition. *Can Vet J.* 50: 383-388.

Rafia, S.; Taghipour, T.; Khaki, Z.; Bokaie, S.; y Sattari, S. 2012. Effect of body condition score on dynamics of hemogram in periparturient Holstein cows. *Comp Clin Pathol*, 21 (1): 933-943.

Remppis, S.; Steingass, H.; Gruber, L.; y Schenkel, H. 2011. Effects of energy intake on performance, mobilization and retention of body tissue, and metabolic parameters in dairy cows with special regard to effects of pre-partum nutrition on lactation- A review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24 (4): 540-572.

Robson, H.; Siebler, T.; Shalet, S.; y Graham, W. 2002. Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids and thyroid hormones during skeletal growth. *Pediatric Research*, 52 (2): 137 – 147.

Roche, J. R.; Well, A. W.; Overton, T. R.; y Loor, J. J. 2012. Nutritional management of the transition cow in the 21st century – a paradigm shift in thinking. *Proceedings of the 5th Australasian Dairy Science Symposium 2012*.

Rollin, E.; Berghaus, R.; Rapnicki, P.; Godden, S.; y Overton, M. 2010. The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum  $\beta$ -hidroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 93 (3): 978 – 987.

Romero, G.; Restrepo, I.; Muelas, R.; Bueso-Ródenas, J.; Roca, A.; y Díaz, J. 2015. Within-day variation and effect of acute stress on plasma and milk cortisol in lactating goats. *J. Dairy Sci*, 98 (2), 832 – 839.

Ruginosu, E.; Creanga, S.; Sofronie, M.; Anton, A.; y Solcan, G. 2010. The hematologic profile of cattle with reproductive diseases. *Cercetări Agronomice în Moldova*, XLIII, (2): 65-76.

Russell, K.; y Roussel, A. 2007. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Vet Clin Food Anim*, 23 (3): 403 – 426.

Sacadura, F. C.; Robinson, P. H.; Evans, E.; y Lordelo, M. 2008. Effects of a ruminally protected B-vitamin supplement on milk yield and composition of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 14 (4): 111–124

Sahinduran, S.; Sezer, K.; Buyukoglu, T.; Koray, M.; y Cagri, M. 2010. Evaluation of some hematological and biochemical parameters before and after treatment in cows with ketosis and comparison of different treatment methods. *J. Anim. Vet. Adv.*, 9 (2): 266 – 271.

Sakhaee, E.; Kheirandish, R.; Jafari, H.; y Ali, M. 2011. Fatty liver syndrome in dairy herds in southeast Iran. *Comp Clin Pathol*, 20 (1): 75 – 78.

Schoenberg, K.; y Overton, T. 2010. The changing roles of insulin during the transition period. In: Proceedings 2010 Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, 72 nd Meeting. Departamento de ciencia animal en el “New York State College of Agriculture and Life Sciences”. Universidad de Cornell. Nueva York, Estados Unidos.

Sharma, N.; Singh, N. K.; Sing, O. P.; Pandey, V.; y Verma, P. K. 2011. Oxidative Stress and Antioxidant Status during transition Period in Dairy Cows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 24 (4): 479 – 484.

Sobhanirad, S.; Carlson, D.; y Bahari, R. 2010. Effect of zinc methionine or zinc sulfate supplementation on milk production and composition of milk in lactating dairy cows. *Biol Trace Elem Res*, 136 (1): 48 – 54.

Soetan, K. O.; Olaiya, C. O.; y Oyewole, O. E. 2010. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *African Journal of Food Science*, 4 (5): 200 - 222.

Sordillo, L. 2013. Selenium-Dependent Regulation of Oxidative Stress and Immunity in Periparturient Dairy Cattle. *Veterinary Medicine International*, ID 154045, 1 - 8.

Suthar, V. S.; Canelas-Raposo, J.; Deniz, A.; y Heuwieser, W. 2013. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *J Dairy Sci*, 96 (5): 2925 – 2938.

Suttle, N. F. 2010. Mineral Nutrition of Livestock, 4th Edition. Londres, Inglaterra: CAB International.

Stojevic, Z.; Piršljin, J.; Milinković-Tur, S.; Zdelar-tuk, M.; y Beer, B. 2005. Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. *Vet. Arhiv.*, 75 (1): 67-73.

Tadayonfar, S.; y Noaman, V. 2013. Concentration of serum total iodine and thyroid hormones in Holstein cows in central Iran. *J livest Sci Technol*, 1 (1): 26 – 28.

Tóthová, C.; Nagy, O.; Seidel, H.; Konvicna, J.; Farkasová, Z.; y Kovác, G. 2008. Acute phase proteins and variables of protein metabolism in dairy cows during the pre-and postpartal period. *Acta Vet Brno*, 77, 51 – 57.

Van Knegsel, A.; Van den Brand, H.; Graat, E.; Dijkstra, J.; Jorritsma, R.; Decuypere, E.; Tamminga, S.; y Kemp, B. 2007. Dietary energy source in dairy cows in early lactation:

Metabolites and metabolic hormones. *J. Dairy Sci.*, 90 (3): 1477 – 1458. Wathes, C.; Clempson, A.; y Pollott, G. 2013. Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow. *Reprod Fertil Dev*, 25 (1): 48 - 61.

Wathes, C.; Cheng, Z.; Chowdhury, W.; Fenwick, M. A.; Fitzpatrick, R.; Morris, D. G.; Patton, J.; y Murphy, J. J. 2009. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiol Genomics* 39, 1–13.

Weber, C.; hametner, C.; Tuchscherer, A.; losand, B.; Kanitz, E.; Otten, W.; Sauerwein, R. M.; Becker, F.; Kanitz, W.; y Hammon, H. M. 2013. Hepatic gene expression involved in glucose and lipid metabolism in transition cows: Effects of fat mobilization during early lactation in relation to milk performance and metabolic changes. *J Dairy Sci*, 96 (9): 5670–5681.

Winkelman, L. A.; y Overton, T. R. 2012. The effects of increasing doses of 2 preparations of long-acting on short-term plasma profiles of glucose and insulin in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 95 (12): 6974–6982.

Yokus, B.; y Dilek, U. 2006. Seasonal and physiological variations in serum chemistry and mineral concentrations in cattle. *Biol Trace Elem Res*, 109 (3): 255 – 266.

Zachut, M.; Honig, H.; Striem, S.; Zick, Y.; Boura-Halfon, S.; y Moallem, U. 2013. Periparturient dairy cows do not exhibit hepatic insulin resistance, yet adipose-specific insulin resistance occurs in cows prone to high weight loss. *J Dairy Sci*, 96 (9): 5656–5669.

Zebeli, Q.; Sivaraman, S.; Dunn, S. M.; y Ametaj, B. N. 2011. Intermittent parenteral administration of endotoxin triggers metabolic and immunological alterations typically associated with displaced abomasum and retained placenta in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 94 (10): 4968 – 4983.

Zhang, Z.; Li, X.; Wang, H.; Guo, C.; Gao, L.; Liu, L.; Liu, L.; Gao, R.; Zhang, Y.; Li, P.; Wang, Z.; Li, Y.; y Liu, G. 2011. Concentrations of sodium, potassium, magnesium, and

iron in the serum of dairy cows with subclinical ketosis. *Biol Trace Elem Res*, 144 (1-3): 525 – 528.

Zhang, Z.; Liu, G.; Wang, H.; Li, X.; y Wang, Z. 2012. Detection of Subclinical Ketosis in Dairy Cows. *Pak Vet J*, 32 (2): 156 - 160.